

Aus dem Walther-Straub-Institut  
für Pharmakologie und Toxikologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Untersuchung von selektiven und  
nicht-selektiven Cyclooxygenaseinhibitoren  
(COX-Hemmern) bei S-Lost induzierten  
Zellschäden**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Simon Wagner

aus

Essen

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Kai Kehe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz Worek  
PD Dr. Sybille Kraus

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dirk Steinritz, Dr. rer. nat. Tanja Popp

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2021

## Zusammenfassung

Schwefel-Lost (S-Lost) ist ein alkylierender chemischer Kampfstoff, der seine Bekanntheit durch den Gebrauch in kriegerischen Auseinandersetzungen erhielt. Seit seiner ersten Verwendung während des Ersten Weltkriegs folgten zahlreiche weitere Einsätze, wie zum Beispiel im Iran-Irak Krieg in den 80er Jahren oder in Syrien im Jahr 2015. Der Kontakt mit S-Lost führt im ganzen Körper zu schweren Verletzungen. Ist die Haut gegenüber S-Lost exponiert, sind Inflammation, Blasenbildung und Ulzerationen die ersten Reaktionen unter denen der betroffene Mensch leidet. Die genauen molekularen Pathomechanismen sind bis heute noch unklar und Gegenstand aktueller Forschung. Die führende Hypothese geht von Alkylierungen der DNA aus, die zu Replikationsstörungen führt. Das Fehlen eines Antidots sorgt dafür, dass die Therapie exponierter Personen ausschließlich symptomatisch erfolgt. Anti-inflammatorische Substanzen, wie Cyclooxygenase-Inhibitoren (COX-Hemmer) werden verwendet, um die ausgelösten Entzündungen und Schmerzen der Betroffenen zu reduzieren. Eine komplette Beschwerdefreiheit der Exponierten kann so bisher nicht erzielt werden, was weitere Studien über die Pathomechanismen und die Therapie geschädigter Personen notwendig macht. Forschungsergebnisse älterer Studien zeigten unterschiedliche Wirksamkeit der COX-Hemmer bei der S-Lost Therapie. Eine umfassende Analyse wurde bisher nicht durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Parecoxib, die nicht-selektiven COX-Hemmer Ibuprofen, Diclofenac, Acetylsalicylsäure (ASS), Indomethacin und Piroxicam, sowie Paracetamol untersucht. Zum Vergleich wurde der Januskinaseinhibitor Tofacitinib in die Studie eingeschlossen. Mit Hilfe eines XTT-Assays, eines PGE<sub>2</sub>-ELISAS und eines Zytokin-Multiplex-Assays konnten die Viabilität, Zytokin-, sowie PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen betrachtet werden, um die Wirksamkeit der Substanzen zu quantifizieren. Ergebnisse zeigen eine wichtige Rolle der COX in der Entwicklung von Inflammation nach S-Lost Exposition, wobei der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib die beste anti-inflammatorische Wirksamkeit aufweist.

## Abstract

Sulfur mustard (SM) is an alkylating chemical warfare, getting famous by his use in warlike conflicts. Since his first use during the first world war, numerous other uses followed like in Iran-Iraq war in the 80th or in Syria in 2015. Contact to SM causes severe lesions in the whole body. If the skin is exposed to SM, inflammation, blistering and ulcerations are the first reactions from which the affected person suffers. The exact pathomechanisms are still unclear and under research right now. Leading hypotheses is the alkylating of DNA which leads to misreplication. Missing of an antidote means that the therapy of contaminated people is only symptomatic. Anti-inflammatory agents like cyclooxygenase-inhibitors (COX-inhibitors) are used to reduce inflammation and pain of the affected. A complete freedom from complaints of the exposed persons has not been achieved yet, which makes further studies on the pathomechanisms and the therapy of the injured persons necessary. Results of older studies demonstrate the different effectiveness of COX-inhibitors in SM therapy. A comprehensive analysis has not been done yet. In this work, the selective COX-2-inhibitors Celecoxib and Parecoxib, the non-selective COX-inhibitors Ibuprofen, Diclofenac, acetylsalicylic acid (ASA), Indomethacin and Piroxicam, as well as Paracetamol were investigated. To compare, the januskinase-inhibitor Tofacitinib was included in this work. With the help of an XTT assay, a PGE<sub>2</sub>-ELISA and a cytokine multiplex assay, the viability, cytokine- and PGE<sub>2</sub> concentrations could be examined in order to quantify the effectiveness of the substances. Results demonstrate an important role of COX-2 in development of inflammation after SM exposition, whereby the selective COX inhibitor Celecoxib has the best anti-inflammatory activity.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Untersuchung von selektiven und nicht-selektiven Cyclooxygenaseinhibitoren (COX-Hemmern) bei S-Lost induzierten Zellschäden“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 02.08.2021

Simon Wagner

---

(Simon Wagner)

# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung . . . . .	I
Abstract . . . . .	II
Eidesstattliche Versicherung . . . . .	III
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	VI
Veröffentlichungen . . . . .	VII
Publikation . . . . .	VII
Posterpräsentationen und Abstracts . . . . .	VII
Abbildungsverzeichnis . . . . .	VII
Tabellenverzeichnis . . . . .	VIII
Formelverzeichnis . . . . .	IX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Schwefellost . . . . .	1
1.2 Die Cyclooxygenasen . . . . .	2
<b>2 Zielsetzung, Planung und Durchführung der Arbeit</b>	<b>5</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>7</b>
3.1 Verwendetes Zellmodell und Kultivieren der Zellen . . . . .	7
3.2 Schwefellost . . . . .	9
3.3 Bestimmung der Zellviabilität . . . . .	9
3.4 Bestimmung der Parameter für die Hauptversuche . . . . .	10
3.5 Vergiftung und Zugabe der Behandlungssubstanzen . . . . .	11
3.6 Bestimmung der PGE <sub>2</sub> -Produktion . . . . .	12
3.7 Messung der Zytokine . . . . .	12
3.8 Berechnung der relativen Zytokin- und PGE <sub>2</sub> Konzentration und Statistik .	14
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>15</b>
4.1 Festlegung der Versuchsparameter . . . . .	15
4.2 Identifizierung der geeigneten Zytokine als Surrogat-Parameter für die Inflammation . . . . .	18
4.3 Beeinflussung der Viabilität durch die Behandlungssubstanzen . . . . .	19
4.4 Beeinflussung der PGE <sub>2</sub> -Level durch die Behandlungssubstanzen . . . . .	22
4.5 Wirkung von S-Lost und den Behandlungssubstanzen auf die Zytokinproduktion	25

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>46</b>

# Abkürzungsverzeichnis

**ASS** Acetylsalicylsäure

**BSA** bovines Serumalbumin

**CaCl<sub>2</sub>** Calciumchlorid

**COX** Cyclooxygenase

**DMSO** Dimethylsulfoxid

**ELISA** enzymgekoppelter Immunabsorbtionstest

**EtOH** Ethanol

**IL-6** Interleukin 6

**IL-8** Interleukin 8

**KGM2** Keratinozytenwachstumsmedium 2

**NHEK** normale humane epidermale Keratinozyten

**NAC** N-Acetylcystein

**OPCW** Organisation für das Verbot chemischer Waffen

**PARP** Poly(ADP-ribose) Polymerase

**PGE<sub>2</sub>** Prostaglandin E<sub>2</sub>

**pNpp** p-Nitrophenylphosphat

**S-Lost** Schwefellost

**TNF- $\alpha$**  Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$



# Veröffentlichungen

## Publikation

**Simon Wagner**, Simon Lang, Tanja Popp, Anette Schmidt, Horst Thiermann, Dirk Steinritz, Kai Kehe. Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard-induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 312, 109–117 (2019)[1].

## Posterpräsentationen und Abstracts

**Simon Wagner**, Simon Lang, Tanja Popp, Anette Schmidt, Horst Thiermann, Kai Kehe, Dirk Steinritz. Investigation of selective and non-selective cyclooxygenase-inhibitors on sulfur mustard (SM) induced cell damage, 3rd German Pharm-Tox Summit, Göttingen, 2018 Abstract: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 84th Annu. Meet. Ger. Soc. Exp. Clin. Pharmacol. Toxicol. 20th Annu. Meet. Assoc. Clin. Pharmacol. Ger. 391, 42 (2018)[2].

**Simon Wagner**, Simon Lang, Tanja Popp, Anette Schmidt, Horst Thiermann, Kai Kehe, Dirk Steinritz. Untersuchung von selektiven und nicht-selektiven Cyclooxygenaseinhibitoren (COX-Hemmer) bei S-Lost induzierten Zellschäden, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und –pharmazie (DGWMP), Gladbeck, 2017 Abstract: Wehrmed. Monatsschr. Heft 1-2, 32–33 (2018)[3].

Simon Lang, **Simon Wagner**, Tanja Popp, Kai Kehe, Horst Thiermann, Dirk Steinritz. Systematic evaluation of anti-inflammatory effects by cyclooxygenase inhibitor administration after sulfur mustard exposure. 17th Medical Chemical Defense Conference (MCDC), München 2019.

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1	COX-Kaskade. . . . .	3
2	Workflow . . . . .	6
3	Mikroskopaufnahme NHEKs. . . . .	8
4	Strukturformel von S-Lost . . . . .	9
5	Abfolge der Hauptversuche. . . . .	11
6	Zellzahlkurve. . . . .	15
7	XTT über Zeit. . . . .	16
8	Viabilitätskurven von S-Lost, DMSO und EtOH. . . . .	17
9	Viabilitätskurven der Behandlungssubstanzen. . . . .	18
10	Zytokinscreening. . . . .	19
11	Viabilitätsbeeinflussung durch nicht-selektive COX-Inhibitoren. . . . .	20
12	Viabilitätsbeeinflussung durch selektive COX-2-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib. . . . .	21
13	PGE <sub>2</sub> -Konzentrationsveränderung durch nicht-selektive COX-Inhibitoren. . . . .	23
14	PGE <sub>2</sub> -Konzentrationsveränderung durch selektive COX-2-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib. . . . .	24
15	Relative IL-6 Konzentration bei Zugabe von nicht-selektiven COX-Inhibitoren. . . . .	27
16	Relative IL-6 Konzentration bei Zugabe der selektiven COX-2-inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib. . . . .	28
17	Relative IL-8 Konzentration nach der Behandlung mit nicht-selektiven COX-Hemmern. . . . .	29
18	Relative IL-8 Konzentration nach der Behandlung mit selektiven COX-2-Hemmern, Paracetamol und Tofacitinib. . . . .	30
19	Relative TNF- $\alpha$ Konzentration unter Zugabe von nicht-selektiven COX-inhibitoren. . . . .	31
20	Relative TNF- $\alpha$ Konzentration unter Zugabe von selektiven COX-2-inhibitor, Paracetamol und Tofacitinib. . . . .	32

# TABELLENVERZEICHNIS

1	Auflistung der verwendeten Behandlungssubstanzen. . . . .	4
---	---	---

# FORMELVERZEICHNIS

3.1	Berechnung der relativen Viabilität. . . . .	10
3.2	Berechnung der relativen PGE <sub>2</sub> -Ausschüttung . . . . .	14

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Schwefellost

In der wissenschaftlichen Literatur findet man häufig den Chemiker César-Masuète Despretz als Entdecker von Schwefellost (S-Lost) genannt, wobei sich auf eine Publikation von ihm aus dem Jahr 1822 bezogen wird[4–6]. Der Chemiker und Apotheker Albert Niemann schrieb kurze Zeit später über die Rötungen und Blasenbildung, die nach dem Kontakt mit S-Lost entstehen[7]. Während seiner Forschung an S-Lost entdeckte Victor Meyer später eine vereinfachte Methode zur Herstellung der Chemikalie und konnte ebenfalls bei seinen Arbeiten gesundheitsschädigende Effekte durch diese beobachten, wie zum Beispiel Hautausschläge und eine Augenentzündung bei seinem Praktikanten[8]. Diese toxische Wirkung des S-Losts machte man sich einige Jahre später im 1. Weltkrieg zu Nutze, als 1917 in Ypern die Deutschen erstmals S-Lost als Kampfstoff verwendeten[9]. In einem Gelände ausgebracht konnte S-Lost Wegabschnitte für den Feind unpassierbar machen[10]. Auch nach dem Ersten Weltkrieg fand S-Lost Verwendung in bewaffneten Konflikten, wie z.B. dem Iran-Iraq-Krieg in den 80er Jahren[11]. Um dem Gebrauch von Chemiewaffen ein Ende zu setzen, wurde 1997 das internationale Chemiewaffenabkommen von mehreren Nationen unterzeichnet und die Organisation für das Verbot chemischer Waffen (OPCW) gegründet, welche die Einhaltung dieses Abkommens kontrollieren soll[12, 13]. Trotz der vertraglichen Vereinbarungen kommt es auch heute noch zum Einsatz von S-Lost, wie Anhand des Einsatzes in Syrien in 2015 gesehen werden kann[14, 15]. Daneben macht die einfache Produktion und die Möglichkeit einer Großzahl an Menschen einen erheblichen gesundheitlichen Schaden zuzufügen, S-Lost zu einer idealen Waffe für den Terrorismus[6, 16].

Diese gesundheitlichen Schädigungen durch S-Lost-Kontamination zeigen sich klinisch vor allem durch Erytheme mit charakteristischen S-Lost-Blasen und Ulcera. Im späteren Verlauf können durch Hautkontakte mit S-Lost eine Hypo- oder Hyperpigmentierung bzw. eine seborrhoische Dermatitis, Urtikaria, Psoriasis, Ekzeme, maligne kutane Neoplasien oder Narbenbildungen entstehen[4, 5, 17].

Wird der Kampfstoff inhaliert, so führt dies zu Husten, Brustschmerzen sowie der Produktion von Sputum, der blutig tingiert sein kann. Im Mund-Rachenbereich können nach Exposition Ödembildung, Inflammation, sowie Nekrosen beobachtet werden. Bemerkbar macht sich dies beim Patienten durch Schluckstörungen[4, 5, 18]. Es besteht ein hohes Risiko, als Langzeitfolge Asthma bronchiale, chronische Bronchitis, Bronchiektasen, Atem-

wegsverengungen und Lungenfibrose zu entwickeln[19].

Auch die Augen sind bei unzureichendem Schutz betroffen. Gelangt S-Lost in diese, führt dies häufig zu Konjunktivitis und Erosionen der Kornea, sowie Ödeme und Erytheme der Augenlider, kurzfristiger Blindheit, Brennen und Tränen der Augen[4, 5, 20].

Die molekulare Ursache dieser gesundheitlichen Schädigungen ist Thema vergangener und aktueller Forschung, wobei bis heute die Mechanismen nicht in Gänze geklärt werden konnten. Eine Theorie geht von DNA Schädigungen aus, bei denen Purine alkyliert werden und Monoaddukte bzw. Quervernetzungen entstehen, was zu Zellzyklusarrest führt[21–26]. Durch den hervorgerufenen Zellschaden wird die Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) aktiviert, um die Zellreparatur einzuleiten. Hierbei wird  $\text{NAD}^+$  reduziert, wodurch die ATP Produktion gestört und die Nekrose eingeleitet wird[22, 25, 27, 28]. Gleichzeitig reagiert S-Lost mit Gluthation. Hierdurch verliert dieses seine Fähigkeit freie Radikale zu binden und setzt den Körper oxidativem Stress aus[4, 29].

Des weiteren konnte nach S-Lost Kontakt ein Anstieg von Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin 6 (IL-6) beobachtet werden[30]. Zytokine sind eine Gruppe von körpereigenen Botenstoffen, von denen einige bei einer Entzündungsreaktion vermehrt freigesetzt werden können[31]. Um diesen toxischen Effekten entgegenzuwirken, ist bei Kontakt die erste Maßnahme die Dekontamination, welche sowohl dem Schutz der betroffenen Person, als auch des behandelnden Personals dient. Kontaminierte Kleidung und Gegenstände müssen hierfür zunächst entfernt und die Haut mit Substanzen, wie RSDL oder Fuller's Earth dekontaminiert werden. Die Augen werden mit Wasser gespült, um restliches S-Lost auszuwaschen[4, 32–34].

Die weitere Behandlung ist primär symptomatisch. So kommt bei schweren Hautschädigungen ein Wunddebridement in Frage[32, 35]. Zur medikamentösen Behandlung und Vorbeugung von Entzündungen werden anti-inflammatorische Substanzen wie COX-Inhibitoren oder Steroide angewendet, wobei die aktuelle Studienlage unterschiedliche Wirksamkeit der einzelnen Vertreter der COX-Inhibitoren zeigt[36–39]. Eine bestimmte Substanz als Mittel der ersten Wahl wurde bisher nicht identifiziert. Eine weitere medikamentöse Maßnahme besteht in der Applikation von N-Acetylcystein (NAC), welches im Körper befindliches S-Lost binden und unschädlich machen soll, sowie dafür sorgen soll, dass die Konzentration an Glutathion steigt, welches freie Radikale bindet. Ein zellprotektiver Effekt konnte so in-vitro nachgewiesen werden[36, 40, 41].

## 1.2 Die Cyclooxygenasen

Will man die Wirkungsweise der eben genannten COX-Hemmer genauer betrachten, so muss man die Funktion der Cyclooxygenasen genauer verstehen: Cyclooxygenasen sind eine Enzymgruppe, welche vermehrt in entzündlichem Gewebe exprimiert werden[42]. Aus der Arachidonsäure werden in der so genannten COX-Kaskade durch die COX Prostaglandine gebildet, die verschiedene biologische Prozesse wie die Nierenfunktion, die Makrophagenfunktion oder Insulinrezeptoren regulieren[43–46]. Eines der gebildeten Prostaglandine ist

Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ), welches an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist[47–51]. Die Cyclooxygenasen können in zwei Isoformen unterteilt werden: Die COX-1 und die COX-2, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark vertreten sind[52]. Während die COX-1 kontinuierlich exprimiert wird, wird die COX-2 bei inflammatorischen Ereignissen vermehrt gebildet[53, 54]. Auch nach S-Lost Exposition ist eine vermehrte COX-2 Produktion zu beobachten[37, 55, 56].

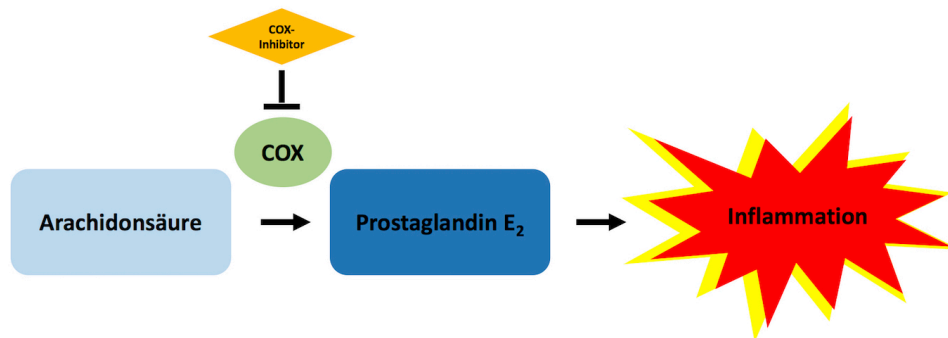


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Funktion der Cyclooxygenase. Die Ausgangssubstanz Arachidonsäure wird unter Beteiligung der COX in  $PGE_2$  umgesetzt[46]. Eine Aufgabe des  $PGE_2$  ist die Steuerung von Inflammation[47–50]. Durch COX-Inhibitoren wird die COX gehemmt, was zu einer Reduktion der Prostaglandinsynthese führt[57, 58].

An der COX-Kaskade setzen die COX-Hemmer an, die in der Medizin in der Behandlung von Entzündung und Schmerzen weit verbreitet sind[59]. Ihre Wirksamkeit erfährt diese Wirkstoffgruppe über eine Hemmung der Cyclooxygenase, wodurch die Kaskade unterbrochen wird und pro-inflammatorische Prostaglandine wie  $PGE_2$  in geringerer Menge produziert werden[57, 58].

Die COX-Inhibitoren können in zwei Klassen unterteilt werden: Die selektiven und nicht-selektiven COX-Inhibitoren, die sich hinsichtlich ihrer Potenz zur Inhibition der COX Subtypen COX-1 und COX-2 unterscheiden. Während die nicht-selektiven Inhibitoren beide Subtypen hemmen, wird durch die selektiven vor allem die COX-2 blockiert[60, 61]. Von Vorteil bei den selektiven COX-2-Inhibitoren ist eine geringere Anzahl an medikamentenassoziierten Magenulzera, wobei das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen steigt[62–65]. Die aktuelle Studienlage zeigt kein einheitliches Verhalten der COX-Inhibitoren bei S-Lost Exposition: Während einige Vertreter dieser Substanzklasse eine anti-inflammatorische Wirksamkeit bei der Behandlung von S-Lost induzierten Entzündungen deutlich machten, zeigten andere keine signifikanten Verbesserungen[37–39]. Zur Untersuchung der Effektivität der COX-Inhibitoren in der Therapie nach S-Lost Exposition wurden Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgesucht. Als Vertreter der nicht-selektiven COX-Inhibitoren

wurden Ibuprofen, Acetylsalicylsäure (ASS), Diclofenac, Piroxicam und Indomethacin gewählt und Celecoxib und Parecoxib als Vertreter der selektiven COX-2-Hemmer. Zusätzlich wurde Paracetamol als untypischer COX-Inhibitor untersucht, dessen genauer Wirkmechanismus noch immer diskutiert wird[66]. Die Inhibition einer weiteren COX Isoform, der COX-3, durch Paracetamol steht in der Diskussion[67].

Als Vergleichssubstanz wurde der Januskinase-Inhibitor (JAK-Inhibitor) Tofacitinib verwendet, eine anti-inflammatorische Substanz, die ihre Wirksamkeit nicht über die COX-Inhibition, sondern der Blockade von JAK1 und JAK3 erhält[68, 69].

Substanz	Eigenschaft
ASS	stark COX-1 selektiv
Ibuprofen	keine COX Selektivität
Diclofenac	keine COX Selektivität
Piroxicam	keine COX Selektivität, lange Halbwertszeit
Indomethacin	keine COX Selektivität, starke COX Bindung
Celecoxib	COX-2 Selektivität
Parecoxib	COX-2 Selektivität, Prodrug von Valdecoxib
Paracetamol	COX-3 Selektivität
Tofacitinib	Januskinase Inhibitor

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Behandlungssubstanzen. ASS, Ibuprofen, Diclofenac, Indomethacin und Piroxicam sind Substanzen mit keiner selektiven Bindungsfähigkeit zu COX-1 oder COX-2. Celecoxib und Parecoxib sind Vertreter der selektiven COX-2-Inhibitoren. Celecoxib, wie auch der aktive Metabolit Valdecoxib von Parecoxib, haben eine stärker ausgeprägte Bindungsfähigkeit zu COX-2, als COX-1. Eine Besonderheit ist der Wirkstoff Paracetamol, mit einer starken Wirksamkeit an der COX-3. Tofacitinib ist eine anti-inflammatorische Substanz, die über eine Hemmung der Janusinkinase ihre entzündungshemmende Eigenschaft erhält[1, 61, 67, 69–73].



## 2. ZIELSETZUNG, PLANUNG UND DURCHFÜHRUNG DER ARBEIT

Nachdem sich für die im vorherigen Abschnitt genannten sieben COX-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib als Testsubstanzen für die Durchführung der Arbeit entschieden wurde, wurde ein Zellmodell ausgewählt: Normale Humane Keratinozyten (NHEK) dienten hierbei als Zellpopulation, um einen Einblick der Vorgänge in der Haut bei S-Lost Kontamination zu erlangen. Nach der Festlegung der Messmethoden (XTT-Assay, PGE<sub>2</sub>-ELISA und Zytokin-Multiplex-Assay) erfolgte in den Vorversuchen die Bestimmung der Zeitintervalle, der optimalen Zellzahl, der Konzentrationen und der zu untersuchenden Zytokine für die Hauptversuche.

In den Hauptversuchen wurden die PGE<sub>2</sub>- und Zytokinkonzentrationen gemessen und Veränderungen der Konzentrationen unter S-Lost Kontamination und nach Behandlung mit den Testsubstanzen betrachtet. Ziel war es, die Substanzen anhand dieser Messungen zu vergleichen und ihre zellprotektive und anti-inflammatorische Wirksamkeit in der Therapie nach S-Lost Exposition zu quantifizieren.

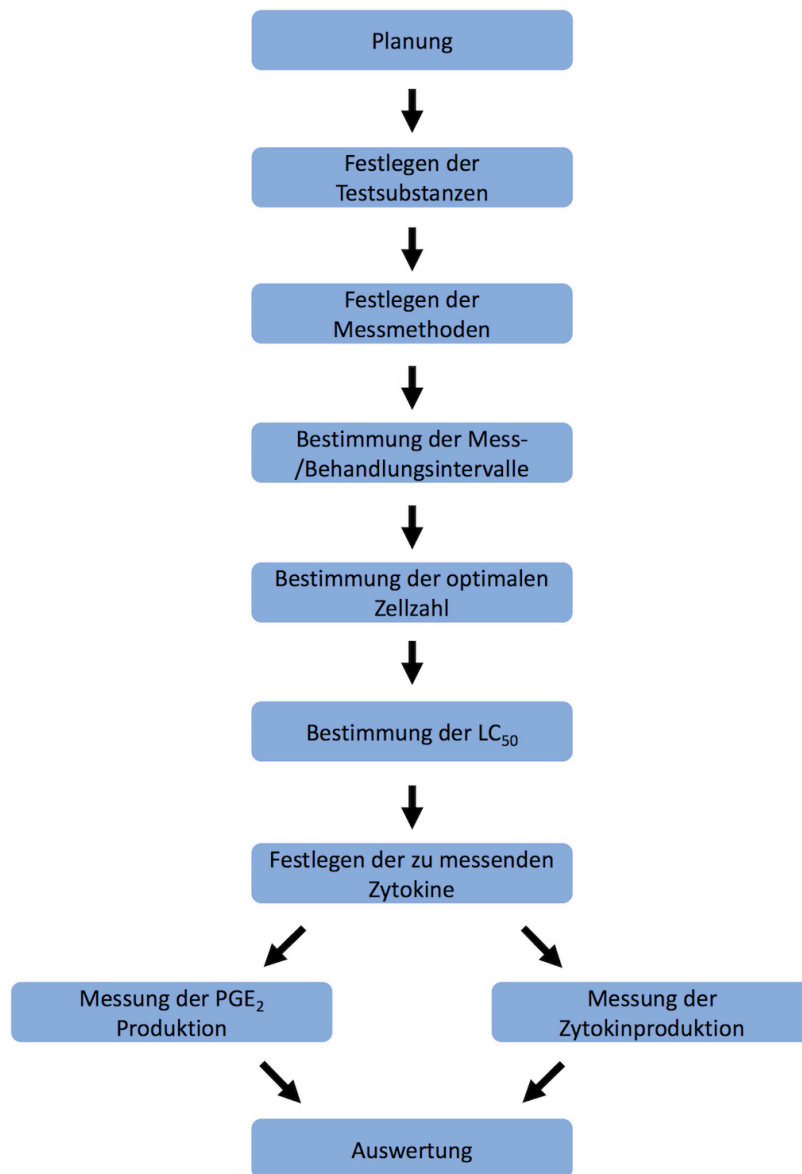


Abbildung 2: Workflow. Nach der Planung der wissenschaftlichen Arbeit wurden verschiedene Vertreter der selektiven und nicht selektiven COX-Inhibitoren, sowie eine Vergleichssubstanz mit anti-inflammatorischer Komponente und anderer Wirkweise festgelegt. Nach Bestimmung der Messmethoden wurde mit verschiedenen Experimenten die Mess- und Behandlungsintervalle, sowie die optimale Zellzahl und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) der einzelnen Substanzen ausgewählt. Mit diesen Daten konnten die Hauptversuche geplant, die untersuchten Zytokine festgelegt und die PGE<sub>2</sub>- und Zytokinlevel bestimmt werden. Die Daten wurden im Anschluss ausgewertet und konnten Rückschlüsse über die Wirkungsweise der COX-Inhibitoren bei S-Lost Exposition geben.

## 3. MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 Verwendetes Zellmodell und Kultivieren der Zellen

Für die folgenden Versuche wurden Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) verwendet, die aus juveniler, menschlicher Vorhaut gewonnen wurden und die Zellen mit dem größten Anteil an der Epidermis darstellen[74]. Keratinozyten sind ein etabliertes Zellmodell, um toxische Effekte unter S-Lost zu beobachten und wurden bereits in früheren Experimenten genutzt[75]. Das verwendete Nährmedium in den Versuchen war Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) von PromoCell mit 0,004 ml/ml Bovine Puritary Extract, 0,125 ng/ml Epidermal Growth Factor, 5 µg/ml Insulin, 0,33 µg/ml Hydrocortison, 0,39 µg/ml Epinephrine, 10 µg/ml Transferrin und 0,06 mM Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) als Bestandteile in den endgültigen Konzentrationen. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge an NHEKs für die Versuche erfolgte eine Kultivierung der Zellen in KGM2 in einem Brutschrank bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre bis zur 8. Zellpassage und eine Anzüchtung in T75 Zellkulturflaschen von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland). Die Zellmenge in den Zellkulturflaschen wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt, mittels Verdünnung in KGM2 die gewünschte Zellzahl eingestellt und auf 96-Well Platten übertragen. Um ein Adhären von den Zellen sicherzustellen wurde die Platte für 24 h inkubiert.

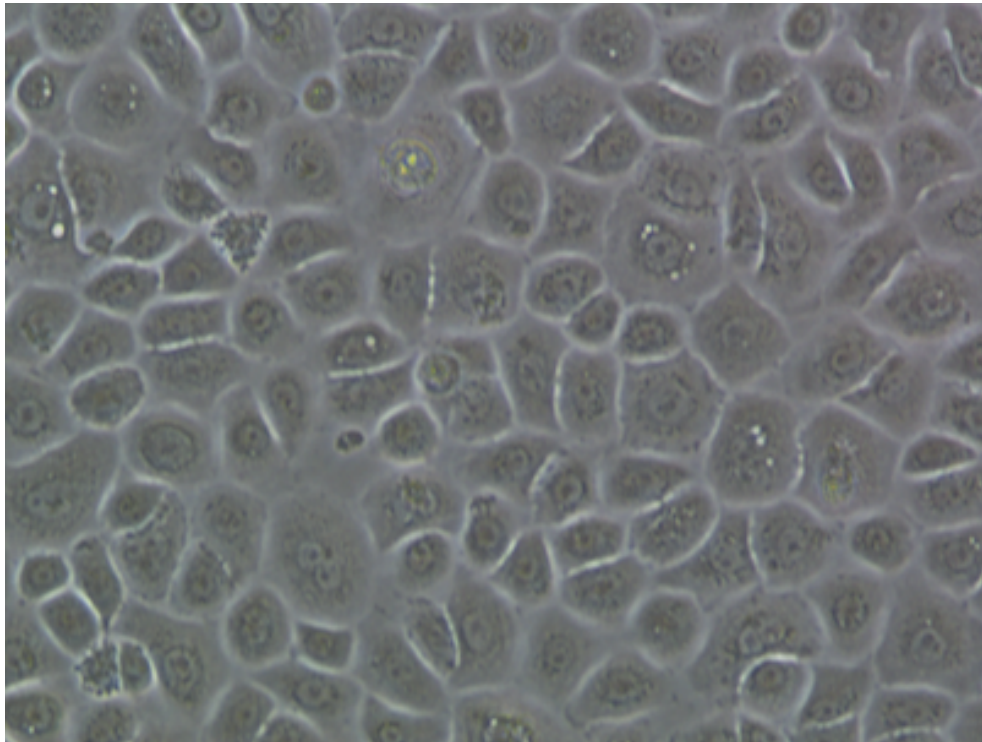


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme NHEKs 20-fach vergrößert: Zu sehen ist ein dichter Zellrasen mit NHEKs. Die Zellen wurden in KGM2 in T75 Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen herangezuchtet. Bei mikroskopisch zu dichtem Zellrasen wurden die Zellen auf weitere Kulturflaschen aufgeteilt.

## 3.2 Schwefellost

S-Lost (Bis(2-chlorethyl)sulfid, CAS-Nr. 505-60-2) wurde durch das Bundesministerium der Verteidigung am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr zur Verfügung gestellt.

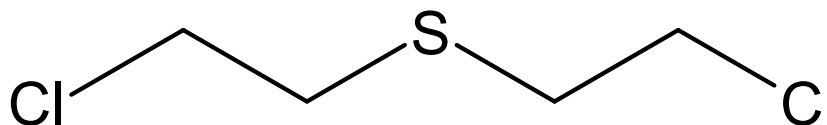


Abbildung 4: Strukturformel von S-Lost. Sie besteht aus einem Schwefelmolekül mit zwei Chloridmolekülen, welche jeweils durch eine Kohlenwasserstoffkette verbunden sind. Die Strukturformel wurde mit ChemSketch gestaltet.[4]

## 3.3 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT-Assay) von Roche Diagnostics (Penzberg, Deutschland) verwendet. Grundlegender Bestandteil dieses Tests ist ein Tetrazoliumsalz. In Anwesenheit von metabolisch aktiven Zellen wird Tetrazolium in ein rosa Formazansalz mit einem spezifischen Absorptionsmaximum umgewandelt. Mit Hilfe einer photometrischen Messung kann somit ein Rückschluss auf die Zellviabilität gezogen werden[76]. Zu Beginn wurden 5 ml XTT-Labeling-Reagenz mit 100 µl Electron Coupling Reagenz zusammengeführt und die Überstände der Proben gesammelt und durch 100 µM KGM2 ersetzt, um die Zellen weiterhin mit Nährstoffen zu versorgen. Die gesammelten Überstände wurden je nach Versuch weiter untersucht und die PGE<sub>2</sub>- bzw. die Zytokinkonzentration bestimmt. Von dem zusammengeführten Reagenz wurde unter Lichtschutz 50 µl in jedes Well gefüllt, die Platten weiter inkubiert und nach 2 Stunden und 4 Stunden bei 450 nm photometrisch mit dem Tecan infinite200Pro Plate Reader (Männedorf, Schweiz) vermessen. Um die photometrischen Messergebnisse zu quantifizieren, diente bei jedem Versuchsdurchlauf eine Kontrolle mit Medium und Lösungsmittel als Referenz, die 100 % viable Zellen enthielt. Andere Gruppen wurden im Verhältnis betrachtet und ein relativer Wert zur Kontrollgruppe berechnet (vgl. Formel 3.1).

$$\text{relative Viabilität}[\%] = \frac{\text{Absorption}_i - \text{Absorption}_{\text{Hintergrund}}}{\text{Absorption}_{\text{Medium+EtOH/DMSO}} - \text{Absorption}_{\text{Hintergrund}}} * 100$$

Formel 3.1: Berechnung der relativen Viabilität. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die photometrischen Messergebnisse des XTT-Assays in Relation zueinander berechnet. Als Kontrollgruppe mit einer 100 % Viabilität wurden die Proben betrachtet, in denen nur das Medium mit dem jeweiligen Lösungsmittel EtOH oder DMSO in nicht toxischer Dosis waren. Bei diesen Proben wurde davon ausgegangen, dass die Zellen ihre ursprüngliche Viabilität behalten. Andere Proben wurden in prozentualer Relation zu diesen Proben betrachtet. Die Absorption mit dem tiefgestellten  $i$  steht für den Absorptionswert einer beliebigen Probe und mit dem tiefgestellte „Medium+EtOH/DMSO“ für den Mittelwert der Absorption der Proben mit Medium und Lösungsmittel.

### 3.4 Bestimmung der Parameter für die Hauptversuche

Um mit einer Zellzahl zu arbeiten, bei der sowohl ein Anstieg, als auch ein Abfall der Zellzahl, zu einer photometrisch messbaren Veränderung der Viabilität führt, wurde die optimale Zellzahl bestimmt. Begonnen mit 100.000 Zellen pro Well wurden durch 2/3 Verdünnungsschritte in KGM2 11 weitere Verdünnungen hergestellt und mit 8 technischen Replikaten pro Verdünnungsschritt und Platte auf zwei 96-Well Platten aufgetragen (Tab.1). Eine Kultivierung der Zellen erfolgte bei einer Platte für 24 Stunden und bei einer zweiten für 48 Stunden, wonach die Viabilität der Proben durch den XTT-Assay bestimmt wurde. Die Ermittlung des Zeitpunkts bei dem ein größtmöglicher Unterschied zwischen verschiedenen S-Lost Konzentrationen gemessen werden kann, erfolgte durch Viabilitätsmessungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. NHEKs wurden 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  S-Lost ausgesetzt und die Viabilität nach einer, drei, sechs und 24 Stunden mit dem XTT-Assay photometrisch gemessen.

Abhängig von der Löslichkeit der zu untersuchenden Substanzen und des S-Losts wurden diese in Ethanol (EtOH) bzw. in Dimethyl Sulfoxid (DMSO) gelöst. Um sicherzustellen, dass die Zellen die verwendeten Konzentrationen der Lösungsmittel tolerieren, wurde die  $\text{IC}_{50}$  von EtOH und DMSO bestimmt und eine Konzentration für die beiden festgelegt. Die  $\text{IC}_{50}$  ist die Konzentration einer Substanz, bei der eine Antwort, in diesem Fall das Ergebnis des XTT-Assays, um 50 % reduziert ist. Da die Plateaus der berechneten Kurven nicht bei 100 % und 0 % liegen wurde die relative  $\text{IC}_{50}$  verwendet [77, 78]. Hierzu erfolgte die Herstellung von 12 verschiedenen Verdünnungen im Verhältnis 1:2 von EtOH bzw. DMSO mit Medium und das Auftragen auf 96-Well-Platte mit NHEKs, wodurch für jeden Verdünnungsschritt acht technische Replikate erzeugt wurden. Analog konnte bei der

Bestimmung der  $IC_{50}$  der Behandlungssubstanzen und S-Lost vorgegangen werden, um die Konzentrationen anzupassen. Die Verhältnisse der Verdünnungsschritte variierten je nach Substanz, wobei von allen Substanzen 11 Verdünnungen hergestellt wurden, um Platz auf der Platte für acht Replikate einer Kontrolle mit KGM2 und Lösungsmittel zu lassen. Ethanol diente als Lösungsmittel für Ibuprofen, Diclofenac, Paracetamol, ASS und S-Lost und DMSO für Piroxicam, Indomethacin, Celecoxib, Parecoxib und Tofacitinib. Nach 24 Stunden Einwirkungszeit der Substanzen wurde der Überstand abgenommen und eine photometrische Messung mittels des XTT-Assays durchgeführt. Die relative Zellviabilität, also die gemessene Absorption in Relation zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz, diente hierbei als Annäherungswert für die restlichen Zellen.

### 3.5 Vergiftung und Zugabe der Behandlungssubstanzen

20.000 Zellen/Well wurden auf zwei 96-Well Platten für jeden Versuchsdurchlauf ausgesät und nach einem Tag Inkubation mit S-Lost vergiftet. Eine Stunde später wurde der Überstand abgesaugt und durch die anti-inflammatorischen Substanzen ersetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zytokinkonzentrationen einer Platte gemessen. Die Überstände der anderen Platte wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um sie später mit dem  $\text{PGE}_2$ -ELISA zu untersuchen. Die leeren 96-Well Platten wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Medium wieder aufgefüllt und mit dem XTT-Assay die Viabilität der Zellen gemessen (Abb.5).

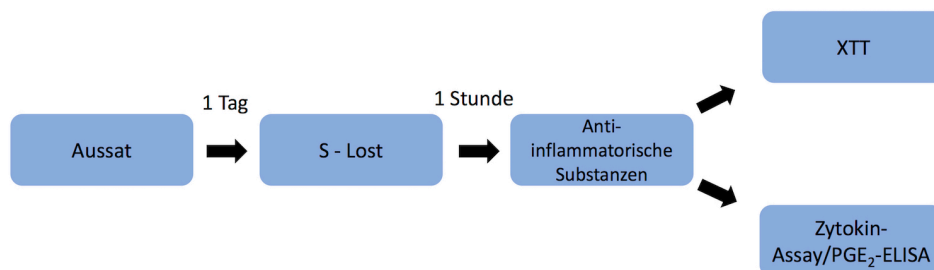


Abbildung 5: Ablauf zur Vorbereitung der Hauptversuche. Nach dem Aussähen wurden die Zellen 24 Stunden später mit S-Lost vergiftet und eine Stunde darauf mit den anti-entzündlichen Substanzen behandelt. Nach 24 Stunden Behandlungsdauer wurden die Viabilität der Zellen mit dem XTT Assay gemessen und die Überstände auf Zytokine und  $\text{PGE}_2$  untersucht.

### 3.6 Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion

Zur Quantifizierung der Inflammation und zur Bestimmung der Wirksamkeit der COX-Inhibition wurde die PGE<sub>2</sub>-Konzentration mit einem enzymgekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA) von Abcam (Cambridge, UK) bestimmt. Mit Hilfe von Antikörpern wird das PGE<sub>2</sub> in einer Probe aufgereinigt. Bei Zugabe von p-Nitrophenylphosphat (pNpp) wird dieses durch die an die Antikörper gebundene alkalische Phosphatase umgewandelt und die Farbintensität nimmt ab. Durch eine hergestellte Verdünnungsreihe bekannter Konzentration kann mit photometrischer Vermessung die Menge an PGE<sub>2</sub> in den Proben bestimmt werden.

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden die Reagenzien des Kits und die eingefrorenen Proben auf Raumtemperatur gebracht. Der Waschpuffer wurde mit 30ml des 20-fach konzentrierten Waschpuffers in 570 ml deionisiertem Wasser hergestellt.

Zur Bestimmung der Konzentration der Proben wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Standard bekannter Konzentration hergestellt. 50 µl des mitgelieferten Standards wurde in 950 µl Medium gelöst. Die weiteren Verdünnungsschritte wurden mit einer 1:1 Verdünnung in KGM2 angefertigt. Die Verdünnungsschritte wurden mit je zwei technischen Replikaten und 100 µl pro Well auf die mit Antikörpern beschichtete Platte aufgetragen. Anschließend wurden die zu untersuchenden Überstände mit 40 µl je Well übertragen. Zwei Kontrollen mit 100 µl KGM2 je Well wurden zusätzlich aufgefüllt. In alle Wells kamen 50 µl Alkalische Phosphatase Konjugat, welches sich an das PGE<sub>2</sub> binden soll. Nach zwei Stunden lichtgeschützter Inkubation auf einer Rüttelplatte bei 500 rpm wurde die Platte dreifach mit 350 µl pro Well gewaschen. Hierdurch wird das PGE<sub>2</sub> aufgereinigt. Die leeren Wells wurden mit 200 µl p-Nitrophenylphosphat (pNpp) je Well wieder aufgefüllt, welches die an das PGE<sub>2</sub> gebundene alkalische Phosphatase umwandelt und für eine Veränderung des Absorptionsspektrums sorgt. Im Folgenden wurde die Platte lichtgeschützt für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 50 µl Stopsolution pro Well eine photometrische Messung bei 405 nm und 580 nm Korrektur durchgeführt.

Mit Hilfe der Ergebnisse der Standardverdünnungen konnte eine Eichgerade angefertigt werden und die PGE<sub>2</sub> Konzentrationen der zu untersuchenden Proben berechnet werden[79].

### 3.7 Messung der Zytokine

Der Bio-Plex Assay erlaubt mehrere Zytokine aus einem Zellüberstand gleichzeitig zu quantifizieren, indem Zytokine in den Proben an bead-gekoppelte Antikörper gebunden werden. Die durch den Tecan Hydroflex (Männedorf, Schweiz), einem magnetischen Washer, zunächst separierten Zytokine werden in einem anschließenden Schritt mit einem zytokinspezifischem Fluoreszenzmarker versehen, mit Hilfe dessen die einzelnen Subtypen differenziert werden können. Zum Auslesen der Proben dient der Bio-Plex 200 Reader von BioRad (Hercules, USA), der die Konzentrationen auf Grundlage einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentration errechnet[80].

Zur Vorbereitung wurden alle Substanzen auf Raumtemperatur gebracht und Bovine-Serum-



Albumin-Lösung (BSA-Lösung) mit 175 mg Bovines-Serum-Albumin (BSA) und 10 ml Keratinocte Growth Medium 2 (KGM2), sowie Standarddiluent aus 100 mg BSA und 20 ml KGM2 und eine Washpufferlösung hergestellt. Der Standard des Kits wurde in 500  $\mu$ l mitgeliefertem Lösungsmittel gelöst und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Eine Verdünnungsreihe mit 8 verschiedenen Konzentrationen in einem Verhältnis 1:3 wurde hergestellt, wobei zur Produktion der Ausgangskonzentration 128  $\mu$ M des gelösten Standards in 72  $\mu$ M des mitgelieferten Lösungsmittels verdünnt wurde.

Anschließend wurden 575  $\mu$ l magnetische Beads in 5175  $\mu$ l Assay Puffer gelöst und 50  $\mu$ l in jedes Well der mitgelieferten 96 Well-Platte gegeben. Mit Hilfe des magnetischen Washers konnte die Platte mit 100  $\mu$ l Waschpuffer pro Well zweimal gewaschen werden.

Um ein Austrocknen der Beads zu verhindern, erfolgte das Auftragen von 25  $\mu$ l BSA-Lösung in jedes Well. Die Verdünnungen des Standards wurden zu je zwei Replikaten auf die Platte aufgetragen und 50  $\mu$ l/Well des zu untersuchenden Überstands in die restlichen Wells gefüllt. Zwei Wells wurden mit 50  $\mu$ l Standarddiluent als Kontrolle versehen, die Platte lichtgeschützt versiegelt, bei 850 rpm vermischt und unter Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Platte dreimal mit 100  $\mu$ l Waschpuffer pro Well gewaschen und in die leeren Wells 25  $\mu$ l pro Well einer Antikörper-Lösung (300  $\mu$ l Antikörper in 2700  $\mu$ l mitgelieferte Antikörperlösungsmittel) eingefüllt.

Nach 30 min lichtgeschützter Zeit auf dem Laborschüttler bei 850 rpm und Raumtemperatur wurde die Platte mit 100  $\mu$ l pro Well dreimal gewaschen und 50  $\mu$ M einer Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (60  $\mu$ l Streptavidin-Phycoerythrin in 5940  $\mu$ l Assay Puffer) in jedes Well gefüllt. Die Platte wurde erneut lichtgeschützt für 10 min bei 850 rpm auf einen Laborschüttler gestellt und dreimal mit 100  $\mu$ l pro Well gewaschen. Mit 125  $\mu$ l Assay Puffer pro Well und 30 Sekunden auf einem Laborschüttler wurden die Beads resuspendiert und mit dem BioPlex Reader 200 vermessen.

### 3.8 Berechnung der relativen Zytokin- und PGE<sub>2</sub> Konzentration und Statistik

Um Messfehler durch technische Fehler zu minimieren, wurden die Ergebnisse des BioPlex-Assays und PGE<sub>2</sub>-ELISAS durch die zuvor bestimmte relative Viabilität geteilt. Die Quotienten wurden auf den Mittelwert der Quotienten der 50 µM S-Lost Gruppe normiert (vgl. Formel 3.2). Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel (Version 15.36) und Prism GraphPad (Version 7)). Zum Ausschluss von Outliern wurde Grubb's Outliertest mit  $\alpha = 0,0001$  mit GraphPad durchgeführt. Eine optische Darstellung, statistische Vergleiche mittels Wilcox Test, sowie Berechnung der IC<sub>50</sub> erfolgte mit dem Softwarepaket R. Verwendet wurde die Pakete „data.table“, „ggplot2“, „drc“, „ggthemes“, „scales“, „tidyverse“, „knitr“, „ggpubr“, „reshape2“, „RColorBrewer“, „ggpubr“, „gridExtra“ und „egg“.

$$1. PGE_{2via} = \frac{\text{absolute PGE}_2 \text{ Ausschüttung}}{\text{relative Viabilität}}$$

$$2. \text{relative PGE}_2 \text{ Ausschüttung}[\%] = \frac{PGE_{2via}}{PGE_{2via50\mu MSL}} * 100$$

Formel 3.2: Messergebnisse des PGE<sub>2</sub>-ELISA ergaben absolute Werte. Um technische Fehler bei der Behandlung unterschiedlicher Platten auszugleichen, wurde jede Probe durch ihre jeweilige relative Viabilität geteilt. Anschließend wurden diese Ergebnisse (PGE<sub>2via</sub>) durch den Mittelwert der Ergebnisse der Gruppe mit 50 µM S-Lost (PGE<sub>2via50µMSL</sub>) geteilt und mit 100 multipliziert. Analog wurde bei der relativen Zytokinbestimmung vorgegangen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Festlegung der Versuchsparameter

Als Menge an Zellen zur Durchführung der Versuche wurde eine Zellzahl gewählt, welche im linearen Bereich der Zellzahlkurven nach 24 und 48 Stunden liegt. In diesem Bereich kann sowohl ein Anstieg, als auch ein Abfall der Zellzahl photometrisch mit dem XTT-Assay vermessen werden. In den folgenden Versuchen wurde eine Zellzahl von 20000 Zellen pro Well verwendet, da bei dieser Zellzahl die Zellen sich sowohl am ersten, als auch am zweiten Tag im linearen Bereich der Zellzahlkurve befanden (Abb.6).

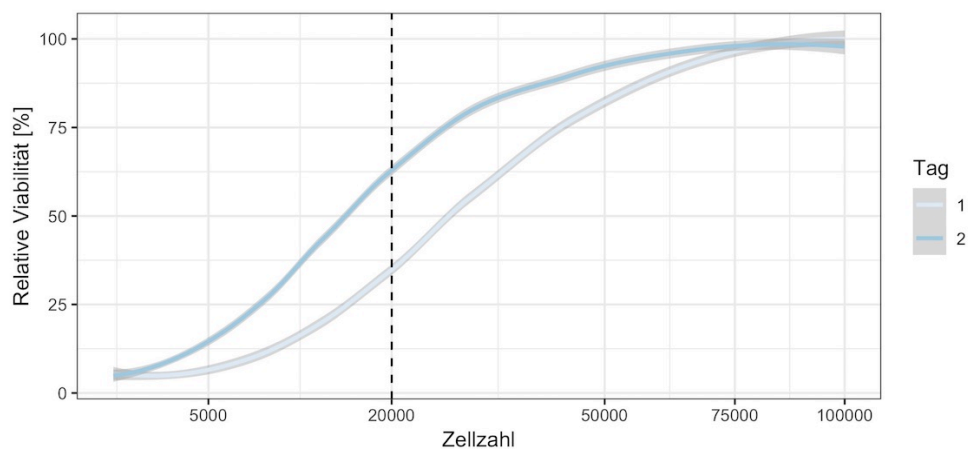


Abbildung 6: Zellzahlkurven. Für die Anfertigung der Zellzahlkurve wurden 12 verschiedene Zellzahlen mit jeweils 8 Proben verwendet. Die gestrichelte Linie markiert 20000 Zellen. Der graue Bereich gibt das 95 % Konfidenzintervall des Curve Fits an. Diese Zellzahl liegt sowohl am ersten, als auch am zweiten Tag im linearen Bereich der Zellzahlkurven.

In den Hauptversuchen wurde die Zeitspanne bis zur Durchführung des XTT-Assays auf 24 Stunden festgesetzt, da hier in den Vorversuchen im Vergleich zu den anderen Intervallen

eine größtmögliche Reduktion der Viabilität festgestellt werden konnte. Hierdurch konnte eine bestmögliche Beobachtung der Viabilitätsänderungen in den Hauptversuchen sichergestellt werden (Abb. 7).

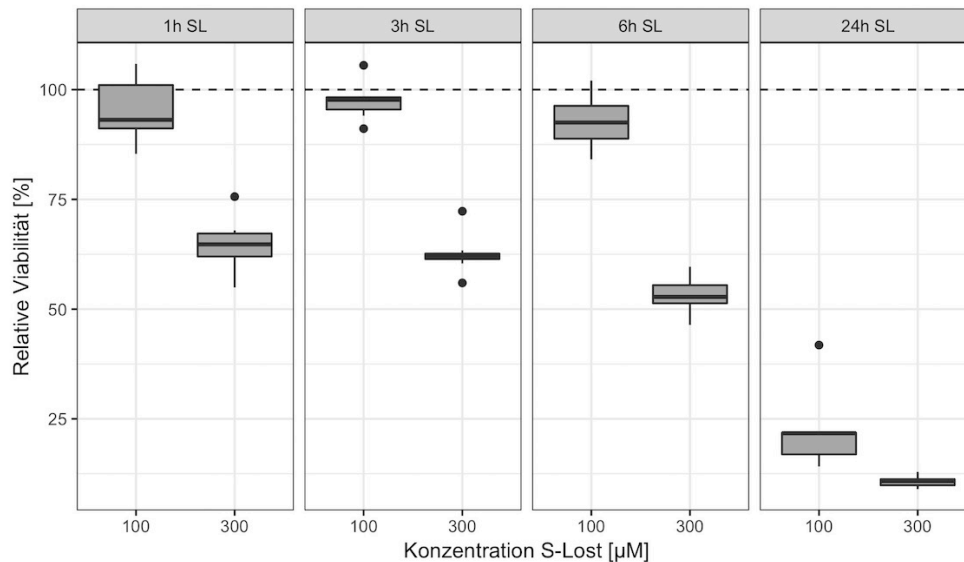


Abbildung 7: Die Graphen zeigen die relative Viabilität nach Exposition mit S-Lost mit 100 µM und 300 µM S-Lost. Die Proben wurden nach 1h, 3h, 6h und 24h nach der S-Lost (SL) Exposition eingefroren. Eine Einwirkzeit von 24h mit S-Lost zeigt die stärkste Reduktion der Viabilität. Ebenso lässt sich ein Unterschied zwischen den verschiedenen S-Lost Konzentration feststellen.

In den Viabilitätstests der Vorversuche wurde eine  $IC_{50}$  von 3,5 % für DMSO und 2,7 % für Ethanol errechnet (Abb. 8), woraufhin in den Hauptversuchen eine Konzentration von 1 % zur Herstellung der Behandlungssubstanzen verwendet wurde, um sicherzustellen, dass keine toxischen Effekte der Lösungsmittel die Ergebnisse der  $PGE_2$ - und Zytokinbestimmung verfälschen. Erste Bestimmungen der Zytokinkonzentrationen zeigten, dass 1 % DMSO zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen führte, weshalb die Konzentration von DMSO auf 0,1 % reduziert wurde.

Bei der Bestimmung der  $IC_{50}$  von S-Lost ergab sich ein Wert von 23,9 µM (Abb. 8), auf dessen Basis in den weiteren Experimenten Konzentrationen von 12,5 µM, 25 µM und 50 µM S-Lost ausgewählt wurden, um leichte bis starke toxische Effekte auf die NHEKs zu erhalten.

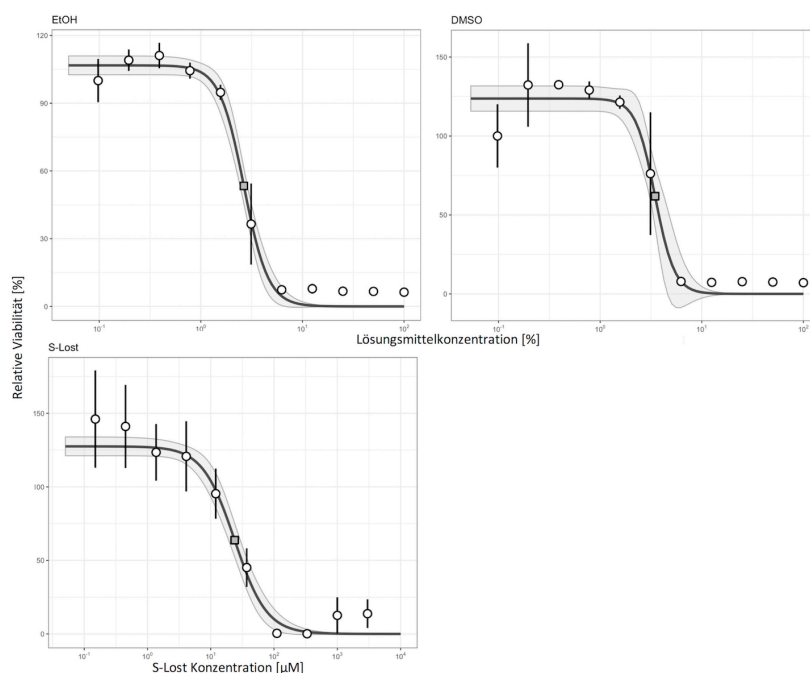


Abbildung 8: Bestimmung der  $IC_{50}$  von EtOH, DMSO, S-Lost mittels XTT-Test. Nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden wurde der XTT-Assay durchgeführt. Durch die weitere Berechnung der Ergebnisse ergab sich für S-Lost eine  $IC_{50}$  von  $23.9 \mu\text{M}$ , für EtOH von  $2.7\%$  und DMSO von  $3.5\%$ .

Messungen für die nicht-selektiven COX-Inhibitoren ergaben bei Ibuprofen eine  $IC_{50}$  von  $591.5 \mu\text{M}$ , für Diclofenac von  $166.2 \mu\text{M}$ , für Indometacin von  $689.8 \mu\text{M}$  und für ASS von  $4832 \mu\text{M}$  wobei bei Paracetamol und Piroxicam mit den verwendeten Konzentrationen keine  $IC_{50}$  berechnet werden konnte. Um keine toxischen Effekte durch die Behandlungssubstanzen zu erhalten und eine Vergleichbarkeit der Substanzen untereinander zu gewährleisten wurden auf Grundlage der Vorversuche Konzentrationen von  $15 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  und  $150 \mu\text{M}$  für die nicht-selektiven COX-Inhibitoren gewählt.

Für die beiden selektiven COX-2-Inhibitoren konnte in den Vorversuchen bei Celecoxib eine  $IC_{50}$  von  $33.74 \mu\text{M}$  und für Parecoxib  $558 \mu\text{M}$  bestimmt werden, woraufhin Konzentrationen von  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$  und  $15 \mu\text{M}$  gewählt wurden, um keine zytotoxischen Effekte zu erzielen. Tofacitinib zeigte als Vergleichssubstanz eine  $IC_{50}$  von  $601 \mu\text{M}$ . Zum Vergleich wurde jedoch die gleiche Konzentration, wie für die selektiven COX-2-Inhibitoren ausgesucht.

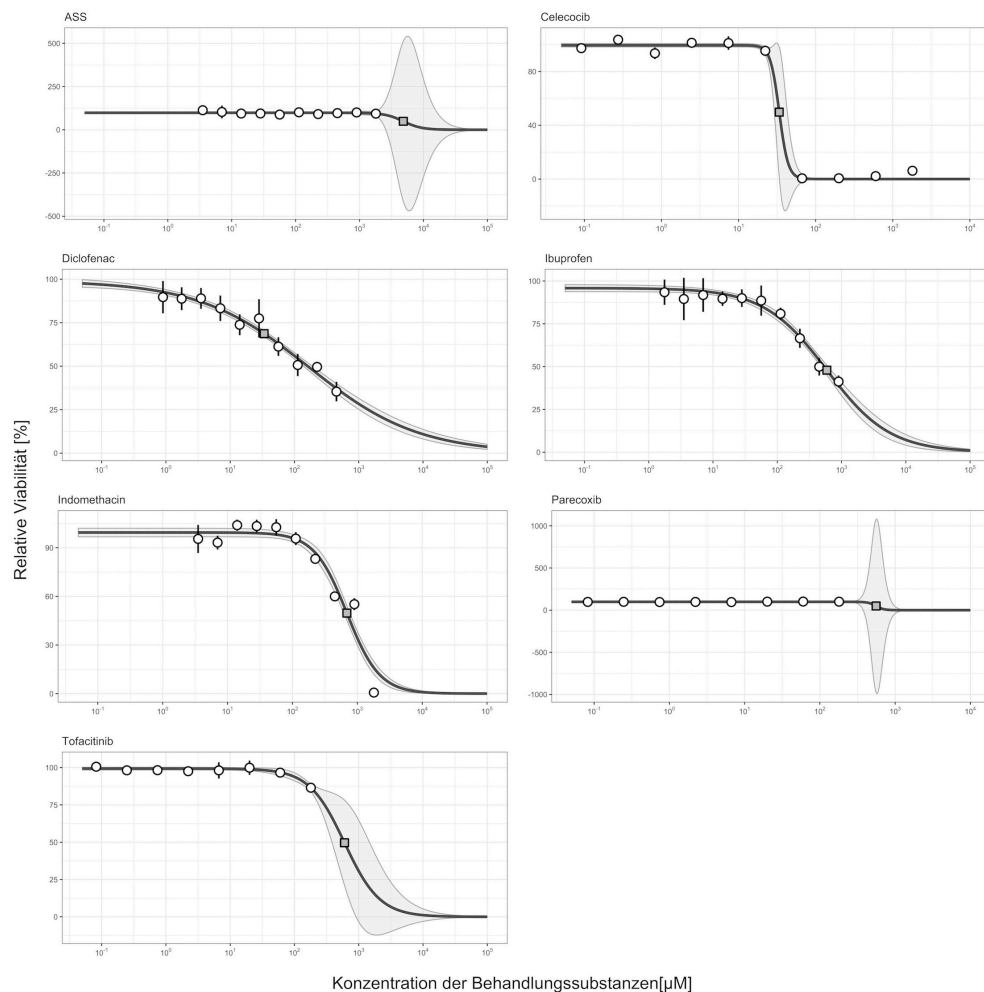


Abbildung 9: Viabilitätskurven der Behandlungssubstanzen zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>. Für Paracetamol und Piroxicam konnte mit den Ergebnissen der verwendeten Konzentrationen keine lineare Regression durchgeführt werden. Die IC<sub>50</sub> wurde für Ibuprofen auf 591.5 µM, für Diclofenac auf 166,2 µM, für Indomethacin auf 689.8 µM, für ASS auf 4832 µM, für Celecoxib auf 33.74 µM, für Parecoxib auf 558 µM und für Tofacitinib auf 601 µM berechnet.

## 4.2 Identifizierung der geeigneten Zytokine als Surrogat-Parameter für die Inflammation

Der verwendete Multiplex-Assay von BioRad ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Zytokine. Um sich auf die Zytokine zu fokussieren, die von Keratinozyten nach S-Lost Exposition in größerem Mengen gebildet werden, wurde ein Screening durchgeführt. Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zeigten

sich hier als besonders geeignet, da diese einen einheitlichen konzentrationsabhängigen Anstieg nach S-Lost-Exposition erfahren (Abb. 10). Eine Differenzierung zur Kontrollgruppe ist ebenfalls möglich. Erfahrungen mit diesen Zytokinen in früheren Studien unterstützen die Auswahl [30, 39, 81, 82].

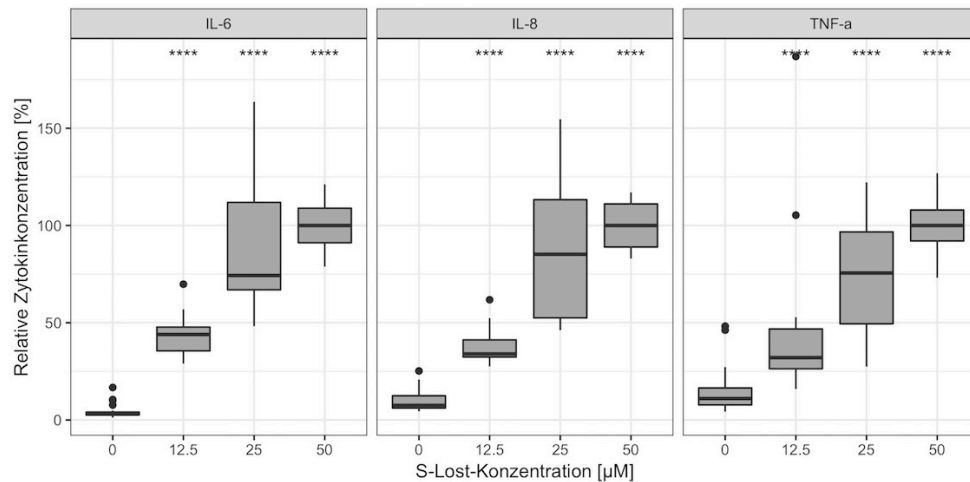


Abbildung 10: Zytokinscreening. Die Graphen zeigen die relative Menge an Zytokinen, die durch Keratiozyten nach S-Lost Exposition exprimiert werden am Beispiel von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ . Zur Identifizierung der sensitivsten Zytokine nach S-Lost Exposition wurde dieser Test durchgeführt. IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  zeigen eine konzentrationsabhängige Steigerung der Zytokinausschüttung. Ein signifikanter Anstieg im Verhältnis zur Kontrollgruppe ist zu verzeichnen. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Vier Sterne(\*\*\*\*) zeigen eine Signifikanz von  $p < 0.0001$  zur Kontrollgruppe

### 4.3 Beeinflussung der Viabilität durch die Behandlungssubstanzen

Ein Kriterium für die Wirksamkeit eines Therapeutikums bei S-Lost-Exposition ist der Erhalt der Viabilität. Eine Abnahme dieser durch S-Lost konnte durch einzelnen anti-entzündlichen Substanzen wie Diclofenac, Ibuprofen, Indomethacin, Paracetamol, Parecoxib und Tofacitinib reduziert werden, wobei keine Dosis-Wirkungsbeziehungen beobachtet werden konnten (Abb. 11+12).

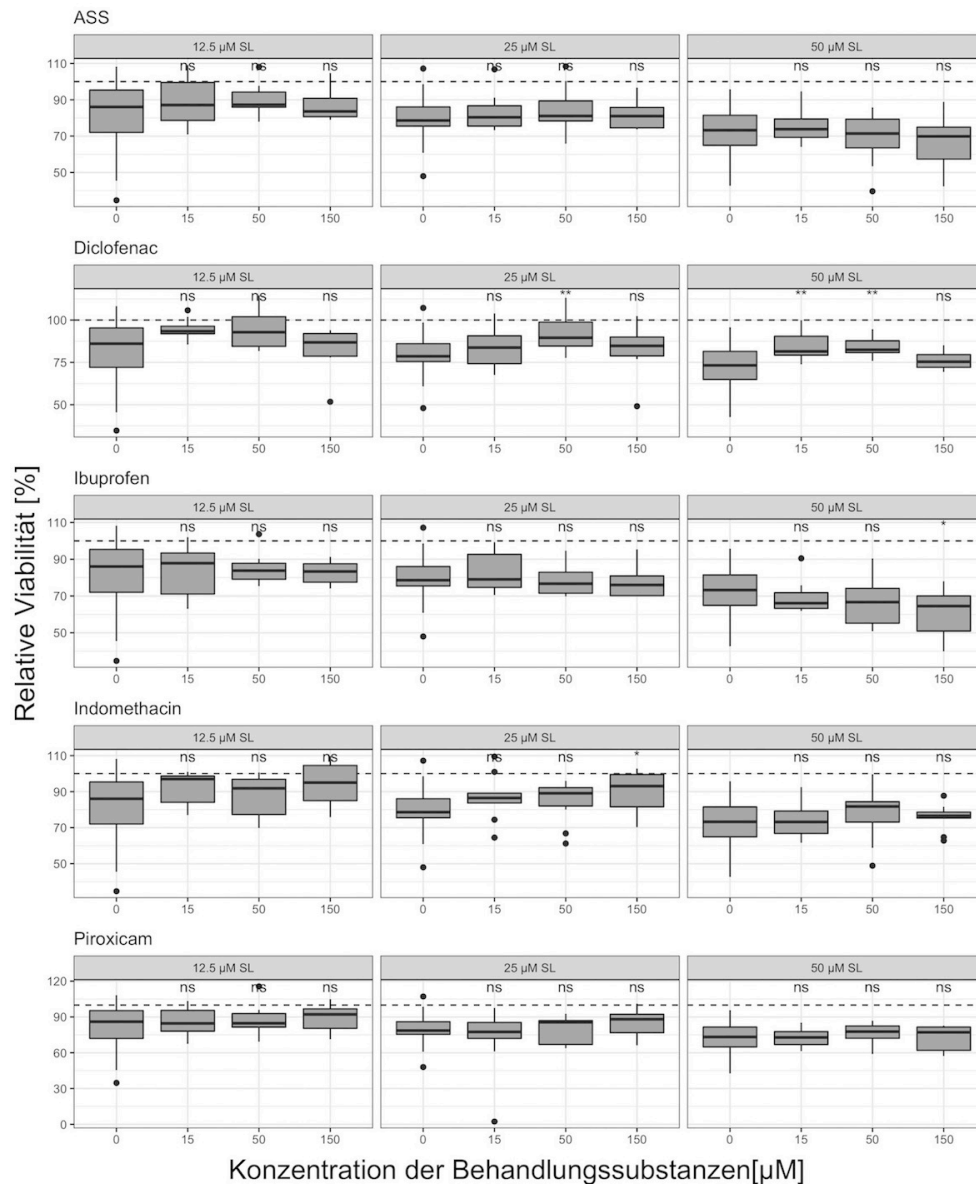


Abbildung 11: Viabilitätsbeeinflussung durch nicht-selektive COX-Inhibitoren. Dargestellt ist die Veränderung der Viabilität nach S-Lost (SL) Exposition in Konzentrationen von 12,5 µM, 25 µM und 50 µM und der Zugabe der nicht-selektiven COX-Inhibitoren. Es zeigt sich kein konzentrationsabhängiger Trend. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Viabilität bei 0 µM S-Lost. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert keine statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ . Zwei Sterne (\*\*) zeigen eine Signifikanz von  $p < 0.01$ .



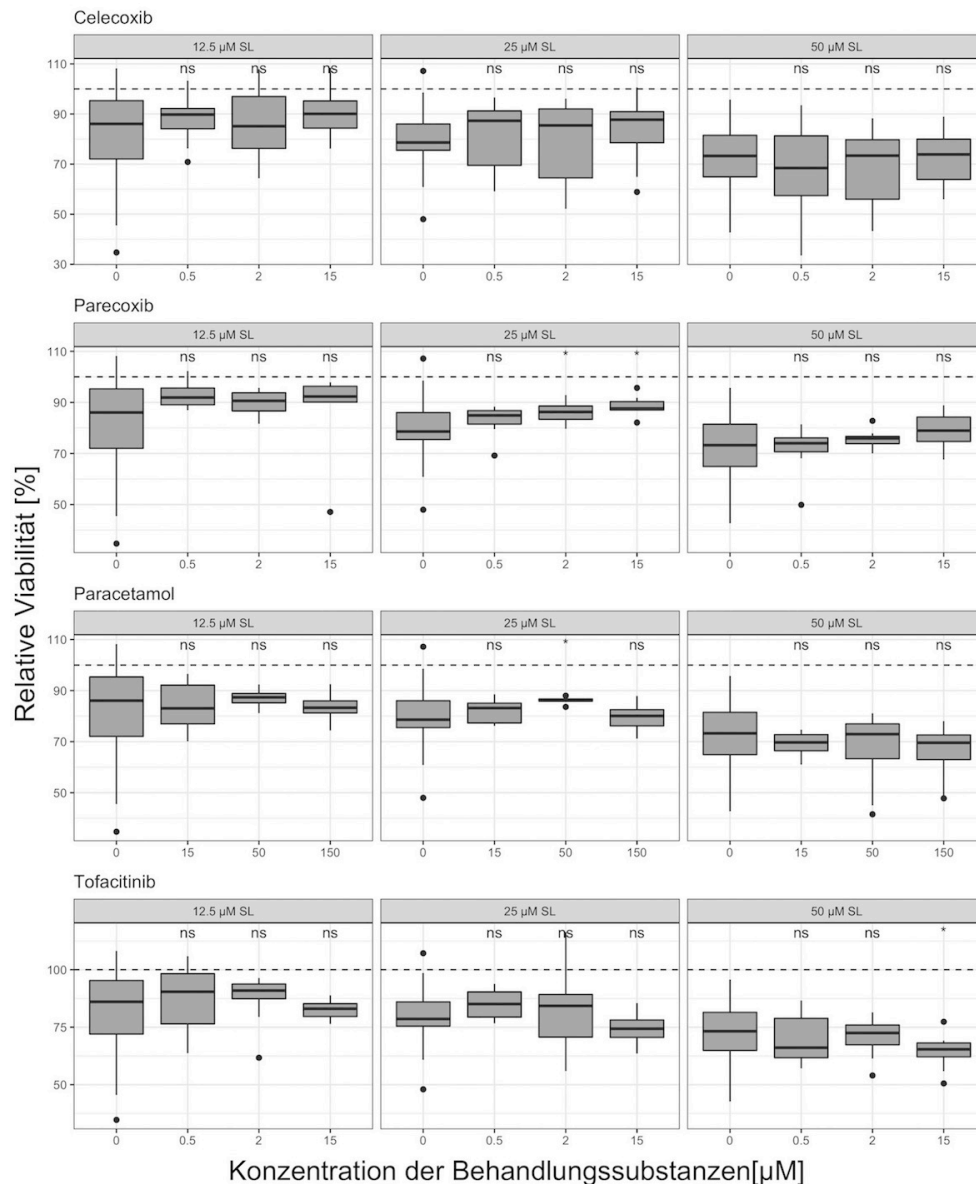


Abbildung 12: Viabilitätsbeeinflussung durch selektive COX-2-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib. Dargestellt ist die Veränderung der Viabilität nach S-Lost (SL) Exposition in Konzentrationen von 12,5 µM, 25 µM und 50 µM und Zugabe der selektiven COX-2-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib. Auch hier konnte kein konzentrationsabhängiger Trend beobachtet werden. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Viabilität bei 0 µM S-Lost. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert keine statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Der Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ .

## 4.4 Beeinflussung der $\text{PGE}_2$ -Level durch die Behandlungssubstanzen

$\text{PGE}_2$  wurde in der Studie als Surrogatparameter betrachtet, um die Inhibition der Prostaglandinsynthese über die COX darzustellen. Es konnte eine Dosis-Wirkungs-Korrelation zwischen der S-Lost Gabe und der ausgeschütteten  $\text{PGE}_2$ -Menge beobachtet werden (Abb. 13+14), wobei die COX-Inhibitoren alle zu einer signifikanten Reduktion des erhöhten  $\text{PGE}_2$ -Spiegels. Der Konzentrationsabfall war hierbei nicht wesentlich anhängig von der verwendeten Konzentration der Behandlungssubstanzen. Im Gegensatz zeigte Tofacitinib als Janusinkinase-Inhibitor keine relevante Reduktion der  $\text{PGE}_2$ -Konzentration (Abb. 14).

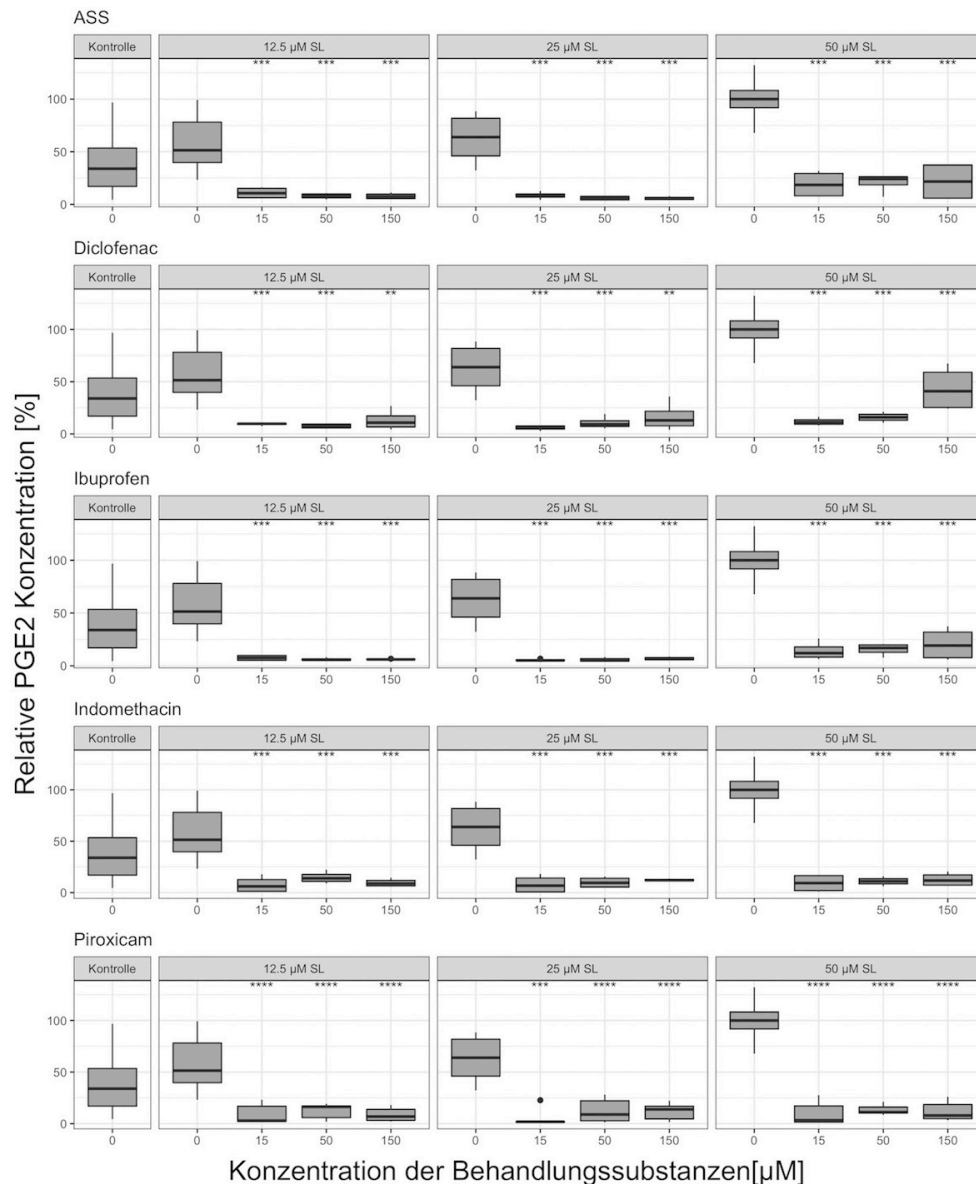


Abbildung 13: PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsveränderung durch nicht-selektive COX-Inhibitoren nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0 µM Behandlungssubstanz im Verhältnis zu den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. Bei allen Gruppen konnte nach Zugabe eines nicht-selektiven COX-Inhibitors eine Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Produktion verzeichnet werden. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppen ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Drei Sterne (\*\*\*) zeigen eine Signifikanz von  $p < 0.001$  und vier Sterne(\*\*\*\*) eine Signifikanz von  $p < 0.0001$ .

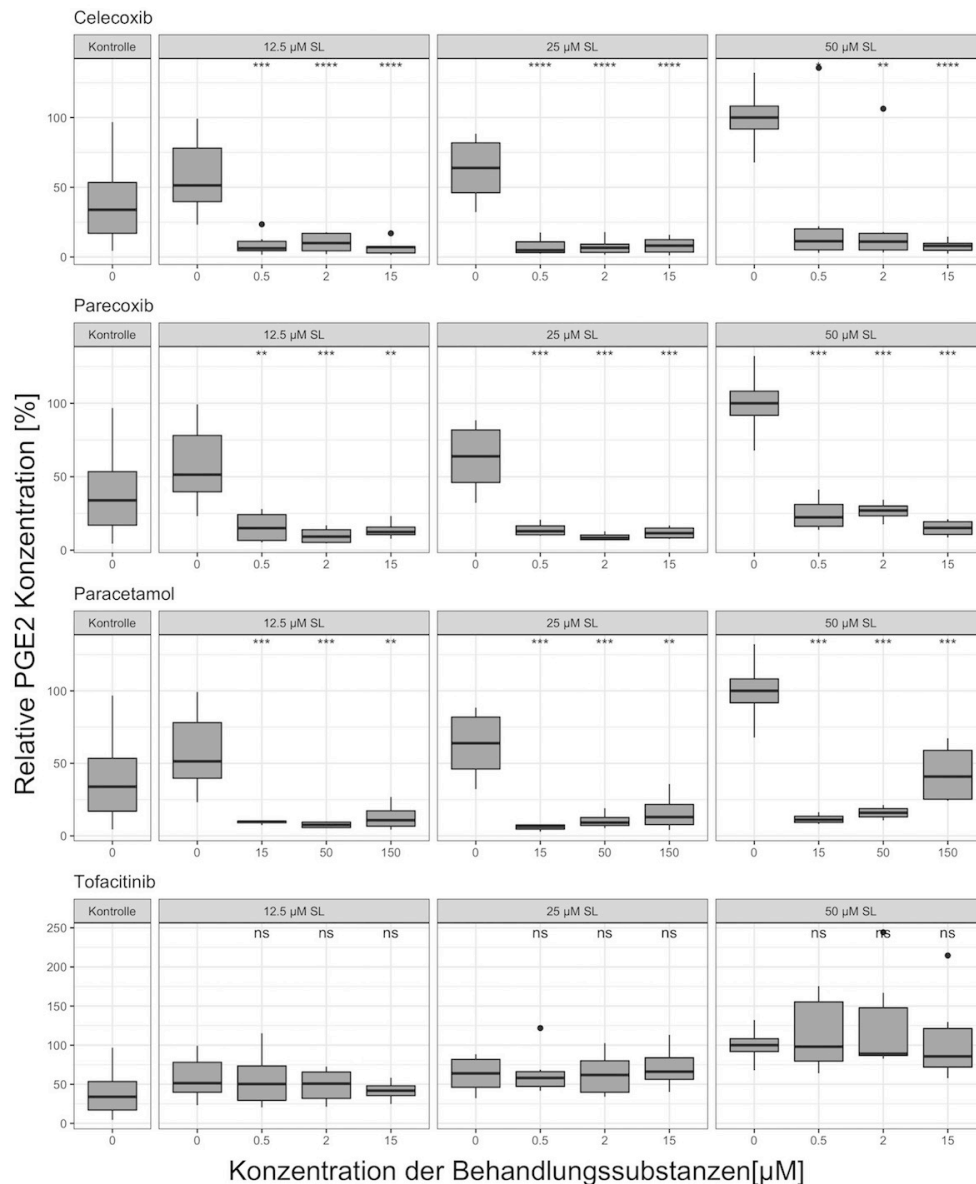


Abbildung 14: PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsveränderungen durch selektive COX-2-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0 µM Behandlungssubstanz mit den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. Außer nach Zugabe von Tofacitinib zeigen alle Gruppen nach Behandlung mit den COX-Inhibitoren eine Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Produktion. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppe ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0.01$ , drei Sterne (\*\*\*) von  $p < 0.001$  und vier Sterne von  $p > 0.0001$  an.

## 4.5 Wirkung von S-Lost und den Behandlungssubstanzen auf die Zytokinproduktion

Eine Exposition gegenüber S-Lost ließ die Ausschüttung der untersuchten Zytokine konzentrationsabhängig ansteigen, wobei die Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant war (Abb. 15-20). Durch die Zugabe der COX-Inhibitoren konnte die Zytokinausschüttung abhängig von der verwendeten Testsubstanz unterschiedlich beeinflusst werden. Celecoxib war unter den untersuchten Substanzen der einzige Vertreter, der zu einer Reduktion sowohl von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  führte und einen besonders starken Rückgang der Zytokinexpression bei der höchsten Konzentration von 15  $\mu$ M Celecoxib aufzeigte. In der Gruppe mit 12,5  $\mu$ M S-Lost konnte so IL-6 von 44,1 % auf 7,6 % (Abb. 16), IL-8 von 37,6 % auf 9,8 % (Abb. 18) und TNF- $\alpha$  von 48,8 % auf 26,9 % (Abb. 20) reduziert werden. Auch bei höheren S-Lost Konzentrationen zeigte sich die anti-inflammatorische Wirksamkeit von Celecoxib, wie man bei einer Exposition mit einer S-Lost Konzentration von 50  $\mu$ M sehen kann, nach der sich die relative Konzentration bei IL-6 von 100 % auf 34,9 % (Abb. 16), bei IL-8 von 100 % auf 32,0 % (Abb. 18) und bei TNF- $\alpha$  von 100 % auf 56,6 % verkleinert (Abb. 20).

Eine weitere Substanz, die zu einer starken Reduktion von IL-6 führte, war Indomethacin, bei der signifikante Abnahmen des IL-6 Spiegels in allen Konzentrationen gefunden werden konnten. So führte bereits die geringste Konzentration von 15  $\mu$ M Indomethacin nach einer Exposition mit 50  $\mu$ M S-Lost zu einer Verminderung der IL-6 Ausschüttung von 100 % auf 68,9 % und bei einer Zugabe von 150  $\mu$ M Testsubstanz zu einer Reduktion auf 28,7 % (Abb. 15). Im Gegensatz zu Celecoxib war Indomethacin nicht in der Lage die IL-8 und TNF- $\alpha$  Konzentrationen nach hohen S-Lost Konzentrationen relevant zu reduzieren (Abb. 17+19). Der Janusinkinase-Inhibitor Tofacitinib zeigte ähnliches Verhalten wie Indomethacin, da auch bei dieser Substanz nur eine signifikante Reduktion von IL-6 nachgewiesen wurde, wobei die IL-6 Spiegel in geringerem Maße als bei Indomethacin reduziert wurden. Die höchste Konzentration von 15  $\mu$ M erreichte nach 50  $\mu$ M S-Lost Exposition eine Reduktion von 100 % auf 56,7 % (Abb. 16).

Diclofenac verringerte ebenfalls den relativen IL-6 Spiegel, zu sehen an einer Reduktion von 100 % auf 44,1 % unter 150  $\mu$ M Diclofenac nach 50  $\mu$ M S-Lost Exposition (Abb. 15). Trotz der guten Wirksamkeit bei IL-6, führte Diclofenac zu einem Anstieg von IL-8, das bei 50  $\mu$ M S-Lost und 150  $\mu$ M Diclofenac von 100 % auf 605,5 % anstieg und von TNF- $\alpha$ , das von 100 % auf 541,7 % zunahm. Auch bereits bei geringerer Diclofenac Konzentration von 15  $\mu$ M wurde ein relativer IL-8 Spiegel von 192,8 % und bei TNF- $\alpha$  von 229,5 % gemessen (Abb. 17+19).

Neben Diclofenac wurde auch bei ASS, Ibuprofen und Paracetamol ein Anstieg von Zytokinen beobachtet, der am ausgeprägtesten bei 50  $\mu$ M S-Lost Exposition und Behandlung mit 150  $\mu$ M der COX-Hemmer zu sehen war. ASS zeigte einen IL-6 Anstieg von 100 % auf 154,5 % (Abb. 15), bei IL-8 von 100 % auf 135,1 % (Abb. 17) und bei TNF- $\alpha$  von 100 % auf

131,2 % (Abb. 19). Bei Ibuprofen stieg die IL-6-Konzentration von 100 % auf 130,5 % (Abb. 15), die IL-8-Konzentration von 100 % auf 226,2 % (Abb. 17) und die TNF- $\alpha$  Konzentration von 100 % auf 293,4 % an (Abb. 19). Paracetamol zeigte lediglich einen Anstieg von TNF- $\alpha$  von 100 % auf 126,6 % (Abb. 20).

Eine Behandlung mit Piroxicam führte vor allem bei der geringsten Konzentration mit 12,5  $\mu$ M S-Lost zu einer Reduktion der IL-6 Ausschüttung, wobei eine Behandlung mit 150  $\mu$ M Piroxicam die IL-6 Konzentration von 44,1 % auf 28,8 % reduzieren konnte (Abb. 15). Die Konzentrationen von IL-8 und TNF- $\alpha$  zeigten keine deutliche Dosis-Wirkungs-Korrelation (Abb. 17+19). Parecoxib beeinflusste die Zytokinausschüttung nicht relevant (Abb. 16,18,20).

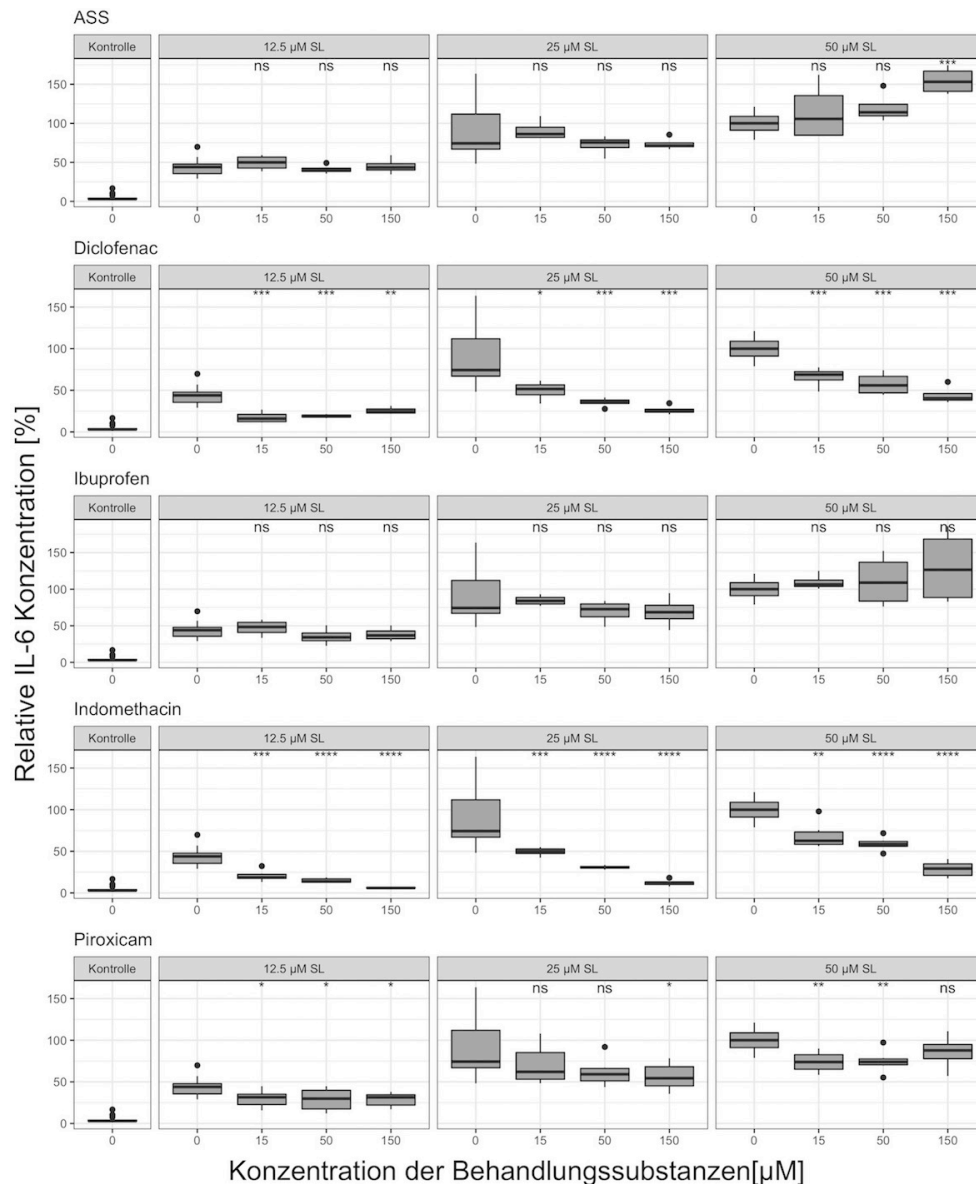


Abbildung 15: Relative IL-6 Konzentration bei Zugabe von nicht-selektiven COX-Inhibitoren nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0 µM Behandlungssubstanz mit den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. Ein Anstieg von IL-6 nach S-Lost Gabe kann in jeder Konzentration verzeichnet werden. Ein Abfall der IL-6 Konzentration war vor allem bei den Gruppen mit Diclofenac und Indomethacin zu verzeichnen. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppen ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0.01$ , drei Sterne (\*\*\*) von  $p < 0.001$  und vier Sterne von  $p > 0.0001$  an.

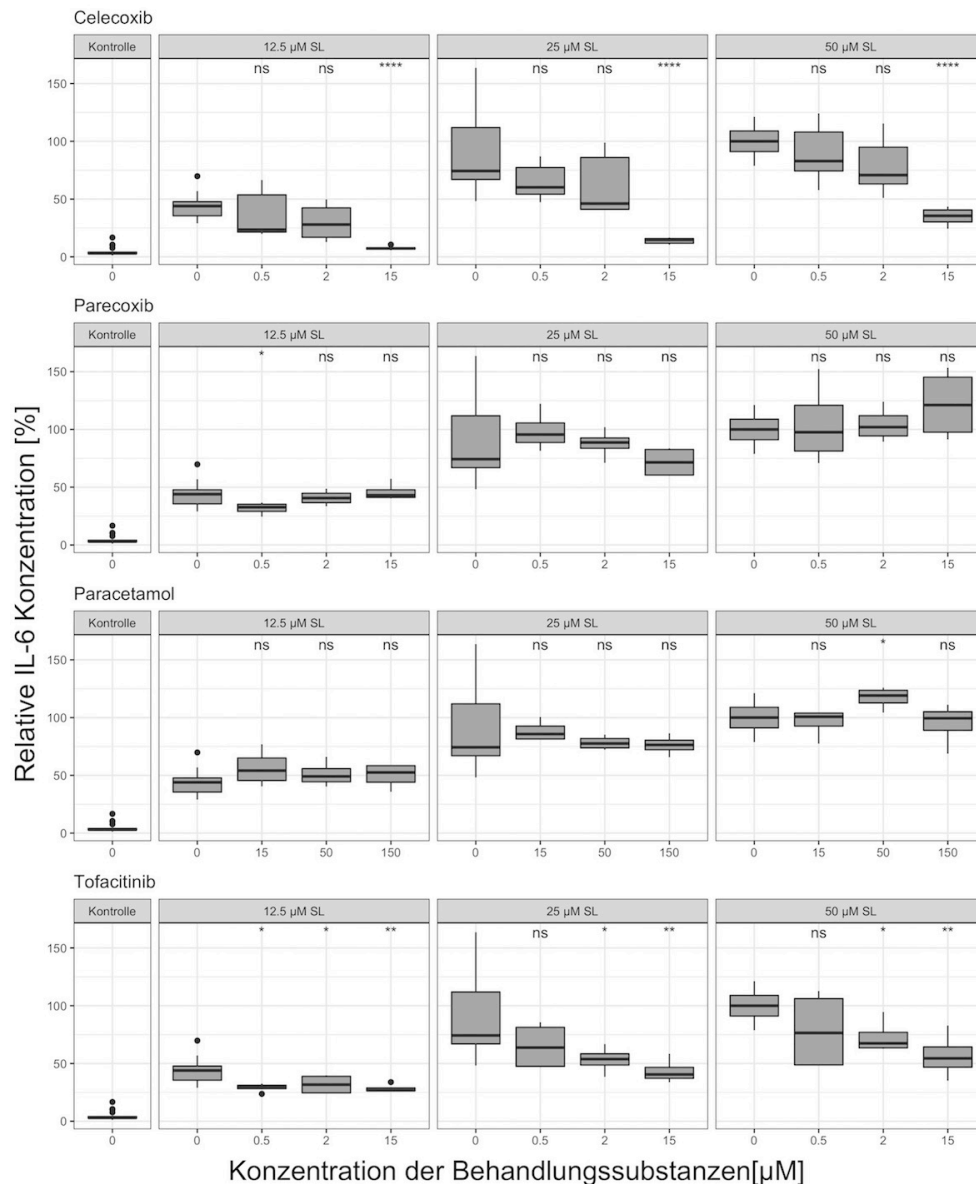


Abbildung 16: Relative IL-6 Konzentration bei Zugabe der selektiven COX-2-Inhibitoren, Paracetamol und Tofacitinib nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0 µM mit den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. Ein Anstieg von IL-6 nach S-Lost Gabe kann in jeder Konzentration verzeichnet werden. Vor allem Celecoxib senkt die IL-6 Ausschüttung nach S-Lost-Exposition. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppen ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0,05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0,01$  und vier Sterne von  $p < 0,0001$  an.



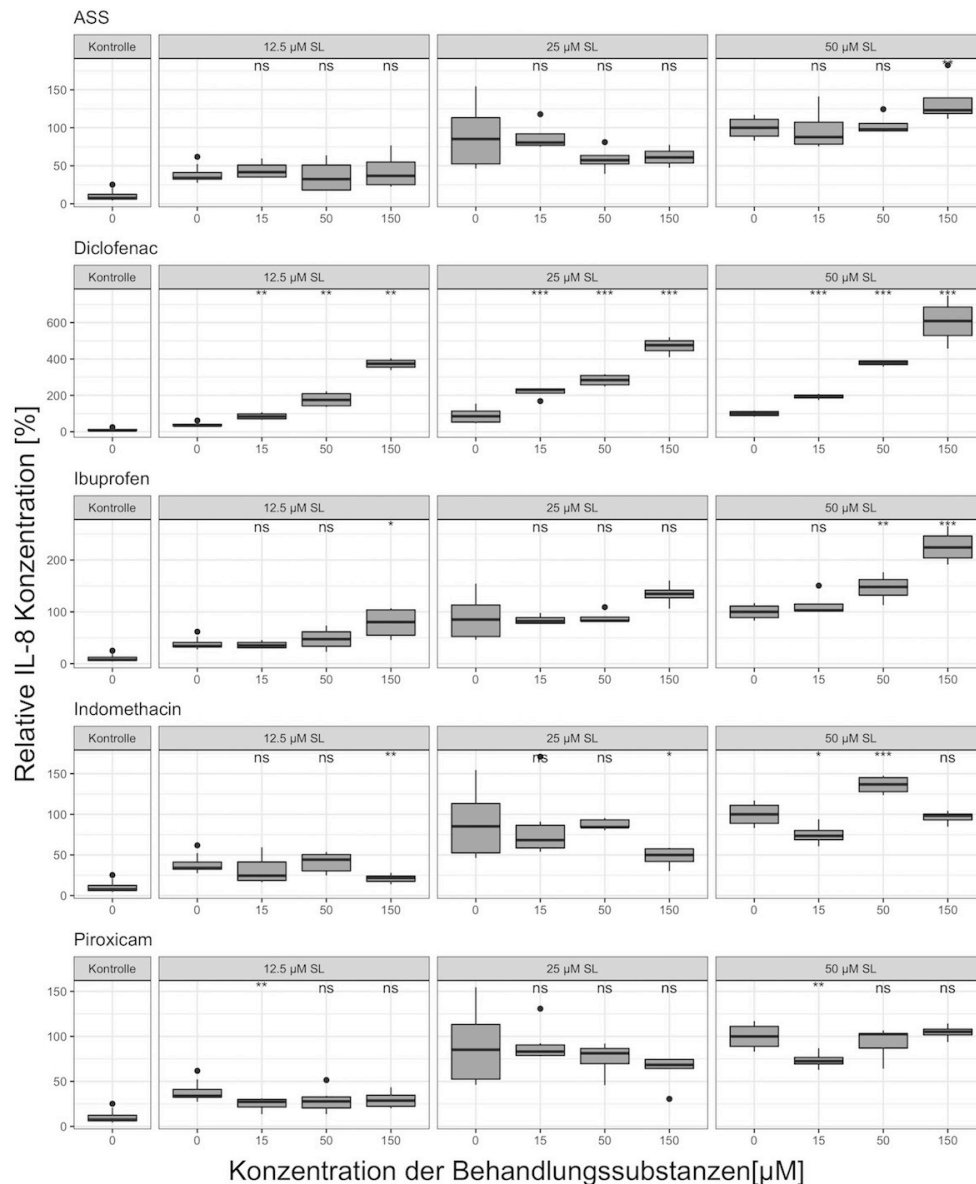


Abbildung 17: Relative IL-8 Konzentration bei nicht-selektiven COX-Hemmern nach einer S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0 µM Behandlungssubstanz mit den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. Indomethacin scheint bei den Gruppen mit wenig S-Lost das IL-8 zu reduzieren. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert Gruppen ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0.01$  und drei Sterne (\*\*\*) von  $p < 0.001$  an.

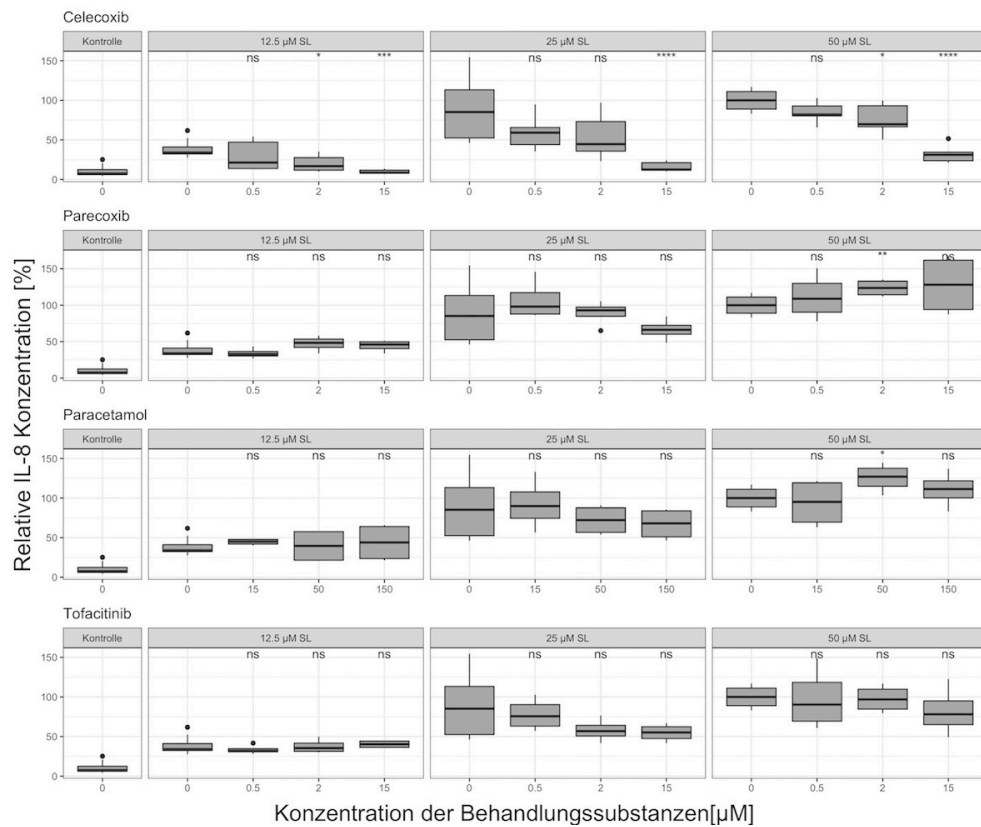


Abbildung 18: Relative IL-8 Konzentration bei selektiven COX-2-Hemmern, Paracetamol und Tofacitinib nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0 µM Behandlungssubstanz mit den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. Auch hier ist vor allem Celecoxib in der Lage den Anstieg von IL-8 nach S-Lost-Exposition zu reduzieren. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppen ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0.01$ , drei Sterne (\*\*\*) von  $p < 0.001$  und vier Sterne von  $p > 0.0001$  an.

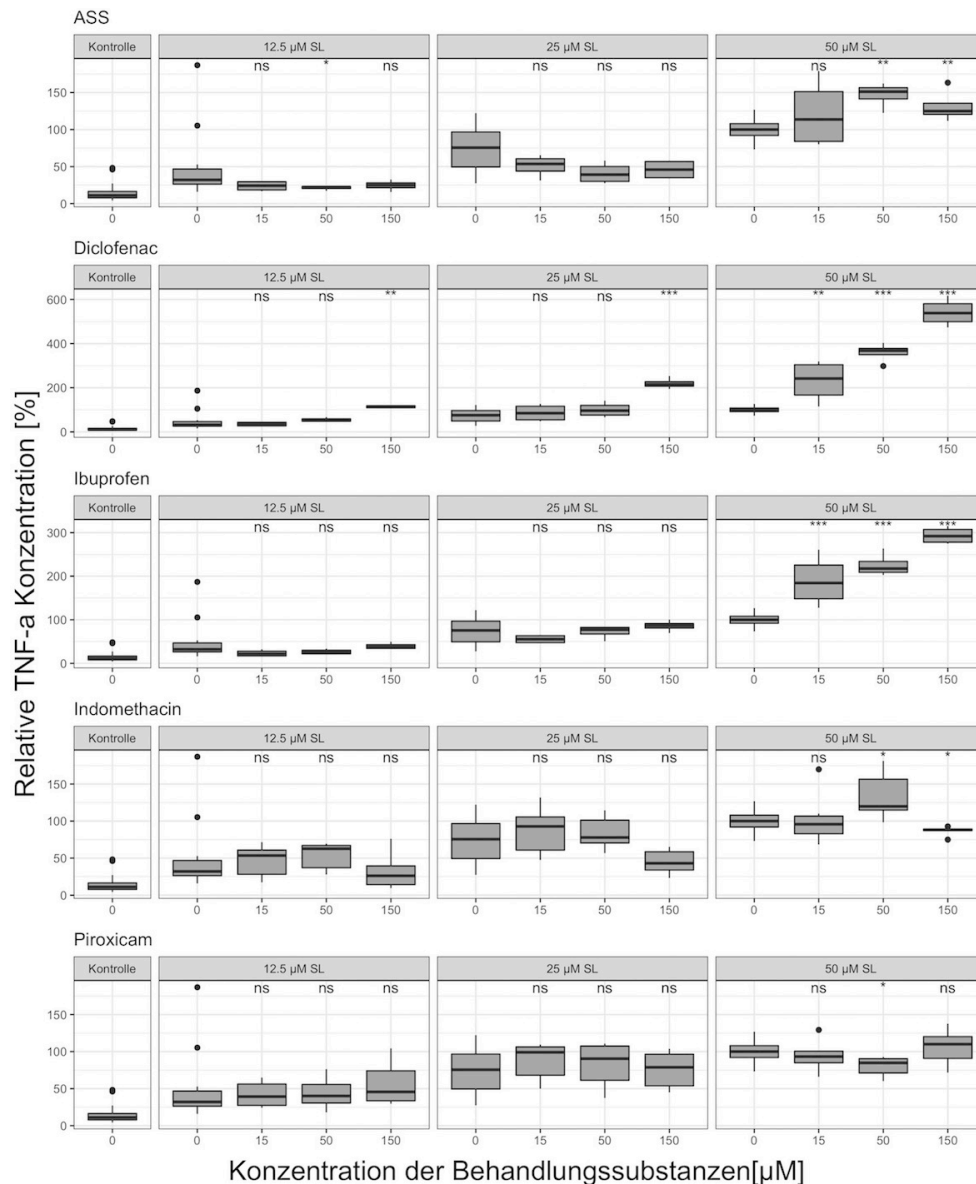


Abbildung 19: Relative TNF- $\alpha$  Konzentration unter Zugabe von nicht-selektiven COX-Inhibitoren nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0  $\mu$ M Behandlungssubstanz mit den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. TNF- $\alpha$  steigt nach S-Lost-Gabe an. Keiner der selektiven COX-2-Inhibitoren reduziert die Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . Diclofenac und Ibuprofen sorgen stattdessen für einen Anstieg. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppe ohne statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0.01$  und drei Sterne (\*\*\*) von  $p < 0.001$  an.

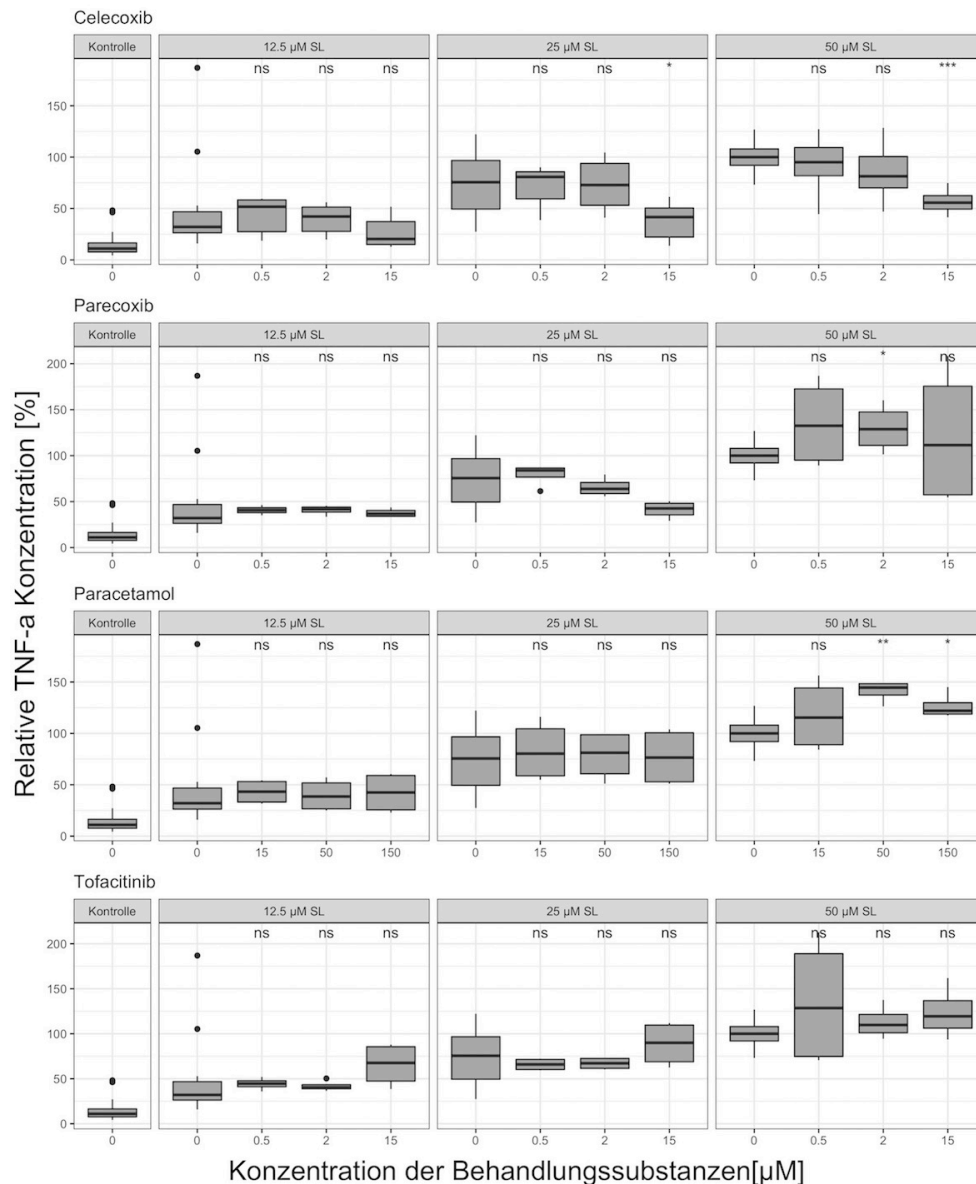


Abbildung 20: Relative TNF- $\alpha$  Konzentration unter Zugabe von selektiven COX-2-inhibitor, Paracetamol und Tofacitinib nach S-Lost Exposition. Verglichen wurde die Kontrollgruppe mit 0  $\mu$ M Behandlungssubstanz zu den anderen Gruppen mit Behandlungssubstanzen. TNF- $\alpha$  steigt nach S-Lost-Gabe an. Celecoxib wirkt auch hier wieder besonders gut, jedoch nur statistisch signifikant bei den höheren Konzentrationen S-Lost. Eine statistische Signifikanztestung zwischen der Kontrollgruppe ohne S-Lost und den anderen Gruppen wurde mit dem Wilcox-Test durchgeführt. Das Kürzel ns markiert die Gruppen die keine statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe ohne Behandlungssubstanz aufweisen. Ein Stern (\*) zeigt eine Signifikanz von  $p < 0.05$ , zwei Sterne (\*\*) von  $p < 0.01$  und drei Sterne (\*\*\*) von  $p < 0.001$  an.

## 5. DISKUSSION

Allen Untersuchungen gemeinsam war eine konzentrationsabhängige Veränderung der untersuchten Messgrößen nach S-Lost Exposition, wie an der Abnahme der Viabilität, sowie einem Anstieg von  $\text{PGE}_2$  und den drei untersuchten Zytokinen deutlich gemacht werden kann. Diese Beobachtungen korrelieren mit klinischen Daten, bei denen Schädigung und Inflammation der Haut nach S-Lost Exposition betrachtet werden konnten[5, 37].

Die Substanzklasse der COX-Inhibitoren ist weit verbreitet in der Therapie entzündlicher Erkrankung[59]. Die für unsere Versuche ausgewählten Vertreter dieser Medikamentengruppe konnten jedoch in der verwendeten Dosierung im Sinne einer Dosis-Wirkungsbeziehung keine Besserung der Viabilität erreichen. Dies lässt vermuten, dass kein relevanter zytoprotektiver Effekt durch COX-Hemmer besteht. Die Möglichkeit einer Wirksamkeit in anderen Dosierungen oder in in-vivo Modellen besteht jedoch weiterhin.

Im Gegensatz zur Viabilität waren alle COX-Hemmer in der Lage, die durch S-Lost angestiegene  $\text{PGE}_2$ -Konzentration zu verringern, wohingegen der Einsatz von Tafacitinib in keiner signifikanten Reduktion resultierte. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die Wirksamkeit der COX Inhibitoren über die Hemmung der COX-Kaskade, in welcher  $\text{PGE}_2$  ein Zwischenprodukt ist, bereits bekannt ist[57, 58]. Dennoch bestätigen die vorgelegten Ergebnisse einen anti-inflammatorischen Effekt durch die COX-Inhibitoren über die COX-Kaskade nach S-Lost Exposition. Da die Reduktion der  $\text{PGE}_2$ -Produktion in allen drei verwendeten Konzentration gleich stark ausgeprägt ist, die Zytokinexpression jedoch durch einige Testsubstanzen konzentrationsabhängig verändert wurde, kann von weiteren Mechanismen ausgegangen werden, die Einfluss auf die Inflammation nehmen.

Diese Veränderung der Zytokinexpression war im Gegensatz zu den Einflüssen auf die anderen Messgrößen ( $\text{PGE}_2$ , Viabilität) nicht bei allen COX-Hemmern einheitlich. Celecoxib zeigte die stärkste anti-inflammatorische Wirkung, was mit in-vivo Studien von Wormser et al zusammenpasst, in der Celecoxib die Inflammation bei Mäusen reduzierte[37]. Im Gegensatz hierzu konnte durch den zweiten selektiven COX-2-Inhibitor in unserer Studie, Parecoxib, keine relevante Veränderung der Zytokinausschüttung erzielt werden, obwohl Valdecoxib, ein aktiver Metabolit von Parecoxib, eine starke COX-2 Selektivität aufweist[73]. Dies könnte jedoch auch eine mögliche Erklärung für die schlechtere Wirksamkeit sein: Als Prodrug bedarf Parecoxib zunächst einer Aktivierung durch Hydrolysisierung, was zu einem verzögerten Wirkeintritt führen kann, sodass es gegebenenfalls in diesem Studienmodell nicht in der Frühphase anschlägt[71].

Neben Celecoxib als Vertreter der selektiven COX-2-Hemmer konnten auch nicht-selektive

COX-Inhibitoren die gesteigerte Zytokinproduktion reduzieren, wobei Indomethacin die besten Ergebnisse erzielte. Bereits in älteren Studien konnte die anti-inflammatorische Wirksamkeit von Indomethacin im Zusammenspiel mit Lost Derivaten beobachtet werden: So konnte ein Prodrug von Indomethacin im in-vivo Experiment eine entzündliche Reaktion nach N-Lost Kontakt verringern und Dachir et al konnte den anti-inflammatorischen Nutzen von Indomethacin nach S-Lost Exposition am Mäuseohr nachweisen[38, 83]. Indomethacin gehört zu den nicht-selektiven COX-Inhibitoren, die Affinität zur COX-2 Hemmung ist jedoch stark ausgeprägt[72]. Eine anti-entzündliche Wirksamkeit, vor allem über die COX-2, kann hier vermutet werden. Neben der Fähigkeit die COX zu hemmen, ist Indomethacin in der Lage die Menge der Ausgangssubstanz Arachidonsäure der COX-Kaskade zu reduzieren, indem es die Phospholipase A<sub>2</sub> hemmt[84]. Ein zusätzlicher inhibierender Effekt auf die Inflammation über diesen Weg ist denkbar.

Auch Diclofenac war in der Lage die IL-6 Produktion abzuschwächen, was mit ähnlichen Resultaten aus früheren Experimenten einhergeht[39]. Dieser COX-Hemmer zeigt eine starke Affinität zur COX-2, wobei im Gegensatz zu Indomethacin und Celecoxib die IL-8 und TNF- $\alpha$  Produktion erhöht wurde[72]. ASS lässt die Konzentrationen von IL-8 und TNF- $\alpha$  ebenfalls ansteigen und führt zusätzlich zu einer vermehrten Freisetzung von IL-6. Eine mögliche Erklärung ist die hohe COX-1 Selektivität[60, 61]. Eine höhere Verfügbarkeit der Arachidonsäure für die COX-2, durch geringeren Umsatz durch die COX-1, könnten inflammatorische Prozesse nach S-Lost Kontakt triggern. Unterstützt wird diese Theorie auch durch Ibuprofen, das ebenfalls eine starke Affinität zur COX-1 hat und zu einer stärkeren Zytokinausschüttung führt[61].

Neben den bisher genannten COX-Hemmern wurde zusätzlich noch Piroxicam untersucht. In älteren Studien, in denen Piroxicam in Kombination mit Clobetasol und Providon-Iodin bei Mäusen angewendet wurde, konnte eine Reduktion der Inflammation beobachtet werden[85]. In dieser Studie zeigten sich im Gegensatz zur Arbeit von Wormser et al weniger ausgeprägte inhibierende Effekte auf die IL-6 Produktion. Besonders von Bedeutung ist bei Piroxicam, seine lange Wirkdauer und die Fähigkeit die zytokinvermittelte Leukozytenaktivierung zu beeinflussen[86–88]. Es handelt sich dabei um einen nicht-selektiven COX-Inhibitor mit einer geringeren COX-2 Affinität, als die von Indomethacin, was eine mögliche Ursache für die schlechtere anti-inflammatorische Wirksamkeit ist[61].

Paracetamol nimmt unter den untersuchten Substanzen eine besondere Rolle ein. Über den genauen Wirkmechanismus ist man sich bis heute nicht im Klaren, wobei unterschiedliche Wirksamkeiten an verschiedenen Stellen des Körpers beobachtet werden konnte. Beispielsweise zeigte sich im Zentralen Nervensystem ein gutes Ansprechen[66, 89]. Die COX-1 und COX-2 Affinität ist bei Paracetamol weniger stark ausgeprägt, als bei anderen COX-Inhibitoren, wodurch sich das Ausbleiben der Zytokinreduktion erklären lässt[61]. Die leichte Steigerung von TNF- $\alpha$  könnte auf einem bisher unklaren Wirkmechanismus basieren.

Die einzige Substanz in dieser Studie, die nicht in der Lage ist die COX zu hemmen, war Tofacitinib, ein Wirkstoff welcher seine Wirksamkeit durch die Inhibition der JAK-STAT erzielt[68, 69]. Da die JAK-STAT Genexpression bei S-Lost Exposition hochreguliert wird, ist es nicht verwunderlich, dass eine Hemmung der Kaskade eine anti-inflammatorische Wirkung erzielt[90]. Dies konnte anhand der Reduktion der IL-6 Konzentration in dieser

Studie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass verschiedene molekulare Mechanismen Einfluss auf den Pathomechanismus von S-Lost haben und es unterschiedliche Targets in der Therapie der Inflammation nach S-Lost Kontakt gibt. Zusammengefasst deuten die Forschungsergebnisse darauf hin, dass die COX-2 einen entscheidenden Anteil an inflammatorischen Ereignissen nach S-Lost Exposition hat und ein geeigneter Ansatzpunkt in der Therapie eines akuten Kontakts darstellen. Substanzen, welche besonders stark die COX-2 hemmen, zeigten die stärkste anti-inflammatorische Potenz. Da COX-Inhibitoren jedoch auch zu Wundheilungsstörungen führen, sollte eine Therapie vor allem in der Akutphase durchgeführt werden[91, 92]. Eine primäre Reduktion der Inflammation und eine damit verbundene Verringerung der assoziierten Hautschäden sollte das Ziel sein. Im Einsatz ist hier eine Erstversorgung nach Kontamination vor Ort denkbar, bei der eine prophylaktische Gabe eines COX-Inhibitors bei Verdacht auf S-Lost Exposition verabreicht wird. Zusätzlich scheinen auch andere molekulare Mechanismen an der Toxizität von S-Lost beteiligt zu sein. Die anti-inflammatorische Wirkung von Tofacitinib trotz fehlender COX Inhibition bekräftigt diese Vermutung.

## 6. AUSBLICK

Bleibt man bei der Vermutung, dass verschiedene Mechanismen eine Rolle in der Toxizität von S-Lost spielen und diese durch unterschiedliche Substanzen beeinflusst werden können, stellt eine kombinierte Therapie mit mehreren Wirkstoffen eine Möglichkeit da, den therapeutischen Effekt zu maximieren. Studien mit kombinierten Substanzen könnten hier weiteren Aufschluss geben.

Neben der Option Substanzkombinationen zu testen, stellen Versuche mit anderen Zelltypen bzw. Co-Kulturen oder in-vivo Modellen eine Möglichkeit da, die bisher an einer Monokultur erhobenen Ergebnisse zu verifizieren oder gegebenenfalls Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zelltypen genauer zu betrachten.

Im Anschluss könnten Versuche am Tiermodell Erkenntnisse erzielen, welche es ermöglichen, eine Therapieempfehlung für die Praxis auszusprechen.



## 7. LITERATUR

- [1] Simon Wagner u. a. „Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard-induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes“. In: *Toxicology Letters* 312 (2019), S. 109–117. ISSN: 18793169. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.03.012. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427419300815?via=ih>.
- [2] Simon Wagner u. a. „Abstracts of the 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 20th Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology Germany (VKliPha) With contribution of the Arbeitsgemei“. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 391.S1 (2018), S. 1–93. ISSN: 14321912. DOI: 10.1007/s00210-018-1477-5. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00210-018-1477-5>.
- [3] Simon Wagner u. a. „Untersuchung von selektiven und nicht-selektiven Cyclooxygenaseinhibitoren (COX-Hemmer) bei S-Lost induzierten Zellschäden (Abstract)“. In: *Wehrmedizinische Monatsschrift* Heft 1-2 (2018), S. 32–33.
- [4] Kai Kehe und Ladislaus Szinicz. „Medical aspects of sulphur mustard poisoning“. In: *Toxicology* 214.3 (2005), S. 198–209. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2005.06.014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084004><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X05002854>.
- [5] K. Kehe u. a. „Acute effects of sulfur mustard injury-Munich experiences“. In: *Toxicology* 263.1 (2009), S. 3–8. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2009.04.060. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482056><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X09002212>.
- [6] Monica Wattana und Tareg Bey. *Mustard gas or sulfur mustard: An old chemical agent as a new terrorist threat*. 2009. DOI: 10.1017/S1049023X0000649X. URL: [http://www.journals.cambridge.org/abstract/\\_S1049023X0000649X](http://www.journals.cambridge.org/abstract/_S1049023X0000649X).
- [7] A. Niemann. „Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaylgas“. In: *Annalen der Chemie und Pharmacie* 113.3 (1860), S. 288–292. ISSN: 00754617. DOI: 10.1002/jlac.18601130304. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlac.18601130304>.
- [8] Victor Meyer. „Ueber Thiodiglykolverbindungen“. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 19.2 (1886), S. 3259–3266. ISSN: 10990682. DOI: 10.1002/cber.188601902358. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/cber.188601902358>.

- [9] Graham S. Pearson. „Veterans at Risk: The Health Effects of Mustard Gas and Lewisite, edited by Constance M. Pechura and David P. Rall.“ In: *Nature* 365.6443 (1993), S. 22. ISSN: 00280836. DOI: 10.1038/365218a0.
- [10] Edward M. Spiers. „The Gas War, 1915-1918: If not a war winner, hardly a failure“. In: *One Hundred Years of Chemical Warfare: Research, Deployment, Consequences*. Cham: Springer International Publishing, 2017, S. 153–168. ISBN: 9783319516646. DOI: 10.1007/978-3-319-51664-6\_9. URL: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-51664-6\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-51664-6_9).
- [11] Hendrik P Benschop u. a. *Verification of Exposure to Sulfur Mustard in Two Casualties of the Iran-Iraq Conflict*. Techn. Ber. 1997. URL: <https://academic.oup.com/jat/article-abstract/21/4/249/679412>.
- [12] OPCW. *Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction*. Techn. Ber. URL: <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC\en.pdf>.
- [13] OPCW. *History / OPCW*. URL: <https://www.opcw.org/about-us/history> (besucht am 17.09.2019).
- [14] Ertugrul Kilic u. a. „Acute intensive care unit management of mustard gas victims: the Turkish experience“. In: *Cutaneous and Ocular Toxicology* 37.4 (2018), S. 332–337. ISSN: 15569535. DOI: 10.1080/15569527.2018.1464018. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15569527.2018.1464018><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29648477>.
- [15] OPCW. *Report of the OPCW fact-finding mission in Syria regarding alleged incidents in Marea, Syrian Arab Republic august 2015*. Techn. Ber. 2015. URL: <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/Fact\Finding\Mission/s-1320-2015\ref.pdf>.
- [16] Kathleen J Smith u. a. *Sulfur mustard: Its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding its mechanism of action, its long-term health effects, and new developments for protection and therapy*. 1995. DOI: 10.1016/0190-9622(95)91457-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722023>.
- [17] Seyed Naser Emadi, Mohammadreza Mortazavi und Hossein Mortazavi. *Late cutaneous manifestations 14 to 20 years after wartime exposure to sulfur mustard gas: A long-term investigation*. 2008. DOI: 10.1001/archderm.144.8.1059. arXiv: 22615505.
- [18] Mike Rowell u. a. „The chronic effects of sulfur mustard exposure“. In: *Toxicology* 263.1 (2009), S. 9–11. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2009.05.015. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X09002662>.
- [19] Ali Emad und Gholam Reza Rezaian. „The Diversity of the Effects of Sulfur Mustard Gas Inhalation on Respiratory System 10 Years After a Single, Heavy Exposure“. In: *Chest* 112.3 (1997), S. 734–738. ISSN: 00123692. DOI: 10.1378/chest.112.3.734. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369216317433>.
- [20] Tamar Kadar u. a. „Ocular injuries following sulfur mustard exposure-Pathological mechanism and potential therapy“. In: *Toxicology* 263.1 (2009), S. 59–69. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2008.10.026.

- [21] Bruno Papirmeister u. a. „Pathology produced by sulfur mustard in human skin grafts on athymic nude mice. II. Ultrastructural changes“. In: *Cutaneous and Ocular Toxicology* 3.4 (1984), S. 393–408. ISSN: 15569527. DOI: 10.3109/15569528409036290. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15569528409036290>.
- [22] Bruno Papirmeister. „Molecular basis for mustard-induced vesication\*1, \*2“. In: *Fundamental and Applied Toxicology* 5.6 (1985), S134–S149. ISSN: 02720590. DOI: 10.1016/0272-0590(85)90123-x. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/027205908590123X>.
- [23] Susan Shahin, Carleen Cullinane und Peter J Gray. „Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by sulphur mustard in keratinocytes“. In: *Chemico-Biological Interactions* 138.3 (2001), S. 231–245. ISSN: 00092797. DOI: 10.1016/S0009-2797(01)00275-7. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279701002757?via%3Dihub>.
- [24] W. J. Smith u. a. „Cytometric analysis of DNA changes induced by sulfur mustard“. In: *Cutaneous and Ocular Toxicology* 12.4 (1993), S. 337–347. ISSN: 15569527. DOI: 10.3109/15569529309050150. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15569529309050150>.
- [25] K. Kehe u. a. *Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering*. 2009. DOI: 10.1016/j.tox.2009.01.019.
- [26] David B. Ludlum u. a. „Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications“. In: *Chemico-Biological Interactions* 91.1 (1994), S. 39–49. ISSN: 00092797. DOI: 10.1016/0009-2797(94)90005-1. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009279794900051>.
- [27] Malgorzata Debiak, Kai Kehe und Alexander Bürkle. „Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity“. In: *Toxicology* 263.1 (2009), S. 20–25. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2008.06.002. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602966https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X08002667>.
- [28] Daniel B. Hinshaw u. a. „Activation of poly [ADP-ribose] polymerase in endothelial cells and keratinocytes: Role in an in vitro model of sulfur mustard-mediated vesication“. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 156.1 (1999), S. 17–29. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1006/taap.1999.8634. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X99986349>.
- [29] R. Vijayaraghavan u. a. „Dermal intoxication of mice with bis(2-chloroethyl)sulphide and the protective effect of flavonoids“. In: *Toxicology* 69.1 (1991), S. 35–42. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/0300-483X(91)90151-P. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300483X9190151P>.
- [30] C. M. Arroyo u. a. „Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard (HD): Cytokine release using a non-enzymatic detachment procedure“. In: *Human and Experimental Toxicology* 18.1 (1999), S. 1–11. ISSN: 09603271. DOI: 10.1191/096032799678839329.

- [31] Claudia Heijmans-Antonissen u. a. „Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1“. In: *Mediators of Inflammation* 2006.1 (2006), S. 28398. ISSN: 09629351. DOI: 10.1155/MI/2006/28398. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864900><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1570387>.
- [32] Jonathan Borak und Frederick R. Sidell. *Agents of chemical warfare: Sulfur mustard*. 1992. DOI: 10.1016/S0196-0644(05)80892-3.
- [33] L Taysse u. a. „Skin decontamination of mustards and organophosphates: Comparative efficiency of RSDL and Fuller’s earth in domestic swine“. In: *Human and Experimental Toxicology* 26.2 (2007), S. 135–141. ISSN: 09603271. DOI: 10.1177/0960327107071866. URL: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0960327107071866>.
- [34] M.R. Safarinejad, S.A. Moosavi und Montazeri B. „Ocular Injuries Caused by Mustard Gas: Diagnosis, Treatment, and Medical Defense“. In: *Military Medicine* 166.1 (2001), S. 67–70. ISSN: 0026-4075. DOI: 10.1093/milmed/166.1.67. URL: <https://academic.oup.com/milmed/article/166/1/67/4819463>.
- [35] John S. Graham u. a. „Medical management of cutaneous sulfur mustard injuries“. In: *Toxicology* 263.1 (2009), S. 47–58. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/j.tox.2008.07.067.
- [36] Dirk Steinritz u. a. „Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations“. In: *Toxicology Letters* 244 (2016), S. 112–120. ISSN: 18793169. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.08.1105. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427415300369?via%3Dihub>.
- [37] Uri Wormser u. a. „Reduced sulfur mustard-induced skin toxicity in cyclooxygenase-2 knockout and celecoxib-treated mice“. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 200.1 (2004), S. 40–47. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1016/j.taap.2004.03.013.
- [38] Shlomit Dachir u. a. „Potential anti-inflammatory treatments against cutaneous sulfur mustard injury using the mouse ear vesicant model“. In: *Human and Experimental Toxicology* 21.4 (2002), S. 197–203. ISSN: 09603271. DOI: 10.1191/0960327102ht229oa. URL: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1191/0960327102ht229oa>.
- [39] Georg Menacher u. a. „Effects of anti-inflammatory compounds on sulfur mustard injured cells: Recommendations and caveats suggested by in vitro cell culture models“. In: *Toxicology Letters* 293 (2018), S. 91–97. ISSN: 18793169. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.09.003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28916287><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427417313358>.
- [40] Mehdi Saberi und Ali Zaree Mahmoodabady. „The protective effects of N-acetyl-cysteine, oxo-thiazolidine-carboxylate, acetaminophen and their combinations against sulfur mustard cytotoxicity on human skin fibroblast cell line (HF2FF)“. In: *Iranian Biomedical Journal* 13.4 (2009), S. 149–155. ISSN: 1028852X. URL: <http://ibj.pasteur.ac.ir>.
- [41] Frank Balszuweit u. a. „Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line“. In: *Toxicology Letters* 244 (2016), S. 35–43. ISSN: 0378-4274. DOI: 10.1016/J.TOXLET.2015.09.002. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427415300424>.

- [42] Hajime Sano u. a. „In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis“. In: *Journal of Clinical Investigation* 89.1 (1992), S. 97–108. ISSN: 00219738. DOI: 10.1172/JCI115591. URL: <https://www.jci.org/articles/view/115591>.
- [43] Mary Ellen Snider, Richard H. Fertel und Bruce S. Zwillig. „Prostaglandin regulation of macrophage function: Effect of endogenous and exogenous prostaglandins“. In: *Cellular Immunology* 74.2 (1982), S. 234–242. ISSN: 10902163. DOI: 10.1016/0008-8749(82)90024-7. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0008874982900247>.
- [44] Jerome Tannenbaum u. a. „Enhanced renal prostaglandin production in the dog. I. Effects on renal function“. In: *Circulation Research* 36.1 (1975), S. 197–203. ISSN: 00097330. DOI: 10.1161/01.RES.36.1.197. URL: <http://ahajournals.org>.
- [45] Tarun K. Ray, Asim K. Dutta-Roy und Asru K. Sinha. „Regulation of insulin receptor activity of human erythrocyte membrane by prostaglandin E1“. In: *BBA - Biomembranes* 856.3 (1986), S. 421–427. ISSN: 00052736. DOI: 10.1016/0005-2736(86)90132-X. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527368690132X>.
- [46] T G Brock, R W McNish und M Peters-Golden. „Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2.“ In: *The Journal of biological chemistry* 274.17 (1999), S. 11660–6. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.274.17.11660. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206978>.
- [47] D C Kuhn und A L Willis. „Prostaglandin E2, inflammation and pain threshold in rat paws“. In: *BRIT.J.PHARMACOL.* 49.1 (1973), S. 183–184. ISSN: 0007-1188. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4787557><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1776402>.
- [48] Pearl Crunkhorn und A L Willis. *Cutaneous reactions to intradermal prostaglandins*. Techn. Ber. 1971, S. 49–56. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1971.tb09934.x. URL: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1476-5381.1971.tb09934.x>.
- [49] Malcolm W Greaves, Jørgen SØndergaard und Wendy McDonald-Gibson. „Preliminary Communications: Recovery of Prostaglandins in Human Cutaneous Inflammation“. In: *British Medical Journal* 2.5756 (1971), S. 258–260. ISSN: 00071447. DOI: 10.1136/bmj.2.5756.258. URL: <http://www.bmj.com/>.
- [50] A. S. Milton und Sabine Wendlandt. „Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits“. In: *The Journal of Physiology* 218.2 (1971), S. 325–336. ISSN: 14697793. DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009620. URL: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1971.sp009620>.
- [51] Masako Nakanishi und Daniel W Rosenberg. *Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer*. 2013. DOI: 10.1007/s00281-012-0342-8. arXiv: NIHMS150003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996682><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3568185>.
- [52] Nina Zidar u. a. „Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform?“ In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13.9 B (2009), S. 3753–3763. ISSN: 15821838. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00430.x.

- [53] G D Anderson u. a. „Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis.“ In: *Journal of Clinical Investigation* 97.11 (1996), S. 2672–2679. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI118717. URL: <http://www.jci.org/articles/view/118717>.
- [54] Ikuo Morita. „Distinct functions of COX-1 and COX-2“. In: *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69 (2002), S. 165–175. ISSN: 00906980. DOI: 10.1016/S0090-6980(02)00029-1. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090698002000291>{\#BIB52}.
- [55] Abraham Nyska u. a. „Effects of iodine on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in sulfur mustard-induced skin injury in guinea pigs“. In: *Archives of Toxicology* 74.12 (2001), S. 768–774. ISSN: 03405761. DOI: 10.1007/s002040000199. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s002040000199.pdf>.
- [56] Michael P. Shakarjian u. a. *Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure*. 2009. DOI: 10.1093/toxsci/kfp253. URL: <https://academic.oup.com/toxsci/article/1628424/Mechanisms>.
- [57] J. R. Vane. „Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs“. In: *Nature New Biology* 231.25 (1971), S. 232–235. ISSN: 00900028. DOI: 10.1038/newbio231232a0. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/newbio231232a0>.
- [58] S. H. Ferreira, S. Moncada und J. R. Vane. „Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen“. In: *Nature New Biology* 231.25 (1971), S. 237–239. ISSN: 00900028. DOI: 10.1038/newbio231237a0.
- [59] G Dannhardt und W Kiefer. „Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects.“ In: *European journal of medicinal chemistry* 36.2 (2001), S. 109–126. ISSN: 0223-5234. DOI: S0223-5234(01)01197-7[pii].
- [60] Francisco J. Blanco Garcia u. a. „Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes“. In: *Journal of Rheumatology* 26.6 (1999), S. 1366–1373. ISSN: 0315162X. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381057>.
- [61] Byron Cryer und Mark Feldman. „Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs“. In: *American Journal of Medicine* 104.5 (1998), S. 413–421. ISSN: 00029343. DOI: 10.1016/S0002-9343(98)00091-6.
- [62] F. L. Lanza u. a. „Specific inhibition of cyclooxygenase-2 with MK-0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen“. In: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 13.6 (1999), S. 761–767. ISSN: 02692813. DOI: 10.1046/j.1365-2036.1999.00529.x. URL: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2036.1999.00529.x>.
- [63] Jay L. Goldstein u. a. „Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor“. In: *American Journal of Gastroenterology* 95.7 (2000), S. 1681–1690. ISSN: 00029270. DOI: 10.1016/S0002-9270(00)00986-2. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002927000009862>.
- [64] Scott D. Solomon u. a. „Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention“. In: *New England Journal of Medicine* 352.11 (2005), S. 1071–1080. ISSN: 00284793. DOI: 10.1056/NEJMoa050405. URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050405>.

- [65] Nancy A. Nussmeier u. a. „Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery“. In: *New England Journal of Medicine* 352.11 (2005), S. 1081–1091. ISSN: 00284793. DOI: 10.1056/NEJMoa050330. URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050330>.
- [66] Brian J. Anderson. *Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action*. 2008. DOI: 10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x. URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x>.
- [67] N. V. Chandrasekharan u. a. „COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.21 (2002), S. 13926–13931. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.162468699. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242329><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC129799><http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162468699>.
- [68] Kamran Ghoreschi, Arian Laurence und John J O’Shea. „Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: To be or not to be?“ In: *Nature Immunology* 10.4 (2009), S. 356–360. ISSN: 15292908. DOI: 10.1038/ni.1701. URL: <http://www.nature.com/articles/ni.1701>.
- [69] Debra M Meyer u. a. „Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis“. In: *Journal of Inflammation* 7.1 (2010), S. 41. ISSN: 14769255. DOI: 10.1186/1476-9255-7-41. URL: <http://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-7-41>.
- [70] Donald C. Hobbs und Thomas M. Twomey. *Piroxicam Pharmacokinetics in Man: Aspirin and Antacid Interaction Studies*. Techn. Ber. 5-6. 1979, S. 270–281. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1979.tb02480.x. URL: <https://accp1.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.1552-4604.1979.tb02480.x>.
- [71] Aziz Karim u. a. „A pharmacokinetic study of intramuscular (IM) parecoxib sodium in normal subjects“. In: *Journal of Clinical Pharmacology* 41.10 (2001), S. 1111–1119. ISSN: 00912700. DOI: 10.1177/00912700122012607. URL: <http://doi.wiley.com/10.1177/00912700122012607>.
- [72] Miyako Kato u. a. „Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes“. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53.12 (2001), S. 1679–1685. ISSN: 0022-3573. DOI: 10.1211/0022357011778070. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1211/0022357011778070/asset/0022357011778070.pdf?v=1&t=jcf4ofj7&s=b887fe364d0867778aeb7836d41617c2ea320876><http://doi.wiley.com/10.1211/0022357011778070>.
- [73] J J Talley u. a. „N-[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration.“ In: *Journal of medicinal chemistry* 43.9 (2000), S. 1661–3. ISSN: 0022-2623. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794682>.
- [74] PromoCell. *PromoCell - Keratinocytes*. URL: <https://www.promocell.com/products/human-primary-cells/keratinocytes/> (besucht am 04.04.2018).

- [75] William J Smith u. a. „The use of human epidermal keratinocytes in culture as a model for studying the biochemical mechanisms of sulfur mustard toxicity“. In: *Cell Biology and Toxicology* 6.3 (1990), S. 285–291. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/%2FBF02443803.pdf>.
- [76] Roche. *Cell Proliferation Kit II (XTT) Bulletin*. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11465015001bul.pdf> (besucht am 31. 03. 2019).
- [77] J. L. Sebaugh. „Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation“. In: *Pharmaceutical Statistics* 10.2 (2011), S. 128–134. ISSN: 15391604. DOI: 10.1002/pst.426. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/pst.426>.
- [78] GraphPad. *GraphPad Prism 7 Curve Fitting Guide - The EC50*. URL: <https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg%50%of%what%relative%vs%absolu.htm><https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg%the%ec50.htm> (besucht am 25. 10. 2020).
- [79] Abcam. *PGE2 ELISA Kit (ab133021) | Abcam*. URL: <https://www.abcam.com/prostaglandin-e2-elisa-kit-ab133021.html> (besucht am 02. 02. 2019).
- [80] Bio-Plex. *Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays Instruction Manual*. Techn. Ber. URL: [www.bio-rad.com/bio-plex..](http://www.bio-rad.com/bio-plex..)
- [81] Xiugong Gao u. a. „Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells.“ In: *BMC cell biology* 8 (2007), S. 17. ISSN: 1471-2121. DOI: 10.1186/1471-2121-8-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524151><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1890552>.
- [82] C L Sabourin, J P Petralli und R P Casillas. „Alterations in inflammatory cytokine gene expression in sulfur mustard-exposed mouse skin.“ In: *Journal of biochemical and molecular toxicology* 14.6 (2000), S. 291–302. ISSN: 1095-6670. DOI: 10.1002/1099-0461(2000)14:6<291::AID-JBT1>3.0.CO;2-B. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083082>.
- [83] Gabriella M. Composto u. a. „Mitigation of nitrogen mustard mediated skin injury by a novel indomethacin bifunctional prodrug“. In: *Experimental and Molecular Pathology* 100.3 (2016), S. 522–531. ISSN: 10960945. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.05.008.
- [84] R C Franson u. a. „Inhibition of highly purified mammalian phospholipases A2 by non-steroidal anti-inflammatory agents. Modulation by calcium ions.“ In: *The Biochemical journal* 186.2 (1980), S. 633–6. ISSN: 0264-6021. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7378071><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1161621>.
- [85] Uri Wormser u. a. „Protective effect of topical iodine containing anti-inflammatory drugs against sulfur mustard-induced skin lesions“. In: *Archives of Toxicology*. Bd. 78. 3. Springer-Verlag, 2004, S. 156–166. ISBN: 9722658425. DOI: 10.1007/s00204-003-0523-2. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-003-0523-2>.



- [86] Takashi Ishizaki, Takeo Nomura und Tohru Abe. „Pharmacokinetics of piroxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory agent, under fasting and postprandial states in man“. In: *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 7.4 (1979), S. 369–381. ISSN: 0090466X. DOI: 10.1007/BF01062535. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF01062535.pdf>.
- [87] Rosario García-Vicuña u. a. „Prevention of cytokine-induced changes in leukocyte adhesion receptors by nonsteroidal antiinflammatory drugs from the oxicom family“. In: *Arthritis and Rheumatism* 40.1 (1997), S. 143–153. ISSN: 00043591. DOI: 10.1002/art.1780400119. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.1780400119>.
- [88] Thomas J. Carty u. a. „Piroxicam, a potent inhibitor of prostaglandin production in cell culture. Structure-activity study“. In: *Prostaglandins* 19.1 (1980), S. 51–59. ISSN: 00906980. DOI: 10.1016/0090-6980(80)90153-7. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0090698080901537>.
- [89] Garry G. Graham u. a. *The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings*. 2013. DOI: 10.1007/s10787-013-0172-x. arXiv: 1003.3921v1. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s10787-013-0172-x>.
- [90] Donald R. Gerecke u. a. „Differential gene expression profiling of mouse skin after sulfur mustard exposure: Extended time response and inhibitor effect“. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 234.2 (2009), S. 156–165. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1016/j.taap.2008.09.020. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955075><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3066660><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X08003967>.
- [91] Ayako Futagami u. a. „Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin“. In: *Laboratory Investigation* 82.11 (2002), S. 1503–1513. ISSN: 00236837. DOI: 10.1097/01.LAB.0000035024.75914.39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429810>.
- [92] Heiko Kämpfer u. a. „Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair“. In: *Journal of Investigative Dermatology* 120.5 (2003), S. 880–890. ISSN: 0022202X. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12140.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713596><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15302591>.

## 8. DANKSAGUNGEN

Ich möchte mich bei Herr PD Dr. Kai Kehe und Herr PD Dr. Dirk Steinritz für die gute Betreuung und Unterstützung bei Planung und Durchführung meiner Arbeit bedanken. Ohne Sie wäre die ganze Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank geht an Herr Prof. Dr. Horst Thiermann dafür, dass ich in seinem Institut die experimentellen Arbeiten durchführen konnte.

Danke auch an meine Mitdoktoranden. Mit eurer Hilfe konnte ich viele Probleme, die während der Arbeit auftraten schnell lösen. Besonders herausheben und danken möchte ich hierbei Simon Lang.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern Ernst und Doris Wagner danken, die mich immer in allen meinen Vorhaben bestärkt und unterstützt haben, sowie meiner Freundin, die während meines Studiums immer für mich da war.